

Charakterisierung der Diphtherietoxin-vermittelten Mortalität im transgenen CD11cDTR Mausmodell

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von:

Dipl.-Ing. Linda Männ

geboren am 20.07.1985 in Berlin

eingereicht am 03.11.2015

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Molekulare und Klinische Immunologie, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, begonnen und am Institut für Experimentelle Immunologie und Bildgebung der Universität Duisburg-Essen weitergeführt und beendet.

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Gunzer
2. Gutachter: Prof. Dr. Astrid Westendorf

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Andrea Vortkamp

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.2016

Publikationen während der Doktorarbeit:

Jens Neumann, Monika Riek-Burchardt, Josephine Herz, Thorsten R. Doeppner, Rebecca König, Heiko Hütten, Eloho Etemire, **Linda Männ**, Anika Klingberg, Thomas Fischer, Michael W. Görtler, Hans-Jochen Heinze, Peter Reichardt, Burkhard Schraven, Dirk M. Hermann, Klaus G. Reymann, Matthias Gunzer

Very-late-antigen-4 (VLA-4)-mediated brain invasion by neutrophils leads to interactions with microglia, increased ischemic injury and impaired behavior in experimental stroke

Acta Neuropathol (2015) 129:259–277

Anja Hasenberg, Mike Hasenberg, **Linda Männ**, Franziska Neumann, Lars Borkenstein, Manuel Stecher, Andreas Kraus, Daniel R Engel, Anika Klingberg, Pegah Seddigh, Zeinab Abdullah, Sabrina Klebow, Swen Engelmann, Annegret Reinhold, Sven Brandau, Michaela Seeling, Ari Waisman, Burkhard Schraven, Joachim R Göthert, Falk Nimmerjahn, Matthias Gunzer

Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes

Nat Methods 2015;12(5):445-52

Eingereichte Publikationen in Revision

Katrin Moses, Johanna Klein, **Linda Männ**, Anika Klingberg, Matthias Gunzer and Sven Brandau

Survival of residual neutrophils and accelerated myelopoiesis limit the efficacy of antibody-mediated depletion of Ly-6G⁺ cells in tumor-bearing mice

Journal of Leukocyte Biology 2015

A-M. Rolle*, M. Hasenberg*, C. Thornton, D. Solouk-Saran, **L. Männ**, J. Weski, A. Maurer, E. Fischer, P. R. Spycher, R. Schibli, F. Boschetti, S. Stegemann-Koniszewski, D. Bruder, G. W. Severin, S. Autenrieth, S. Krappmann, G. Davies, B. J. Pichler, M. Gunzer† & S. Wiehr†

ImmunoPET/MR imaging allows specific detection of *Aspergillus fumigatus* lung infection *in vivo*

* these authors contributed equally; †address correspondence to M.G. or S.W.

PNAS 2015

In Vorbereitung

Linda Männ*, Nora Kochupurakkal*, Christian Martin, Eva Verjans, Stefan Uhlig, Simon Sody, Anika Klingberg, Andreas Kraus, Jill Dalimot, Eileen Bergmüller, Steffen Jung, Sylvia Voortman, Elke Winterhager, Sven Brandau, Urs Eriksson, Matthias Gunzer#, Mike Hasenberg#

CD11c.DTR mice develop a fatal fulminant myocarditis after local or systemic treatment with diphtheria toxin

*# these authors contributed equally

Manuskript liegt vor

Vorträge

- “Characterization of diphtheria toxin-induced mortality in the transgenic CD11cDTR mouse model”
ZMB Lunch Seminar (2015, Essen)
- “Pitfalls when choosing experimental mouse models”
Wintersimar der medizinischen Fakultät (2015, Pichl)
- “Role of alveolar macrophages during pulmonary infection with *Aspergillus fumigatus*”
ZMB Lunch Seminar (2014, Essen)
- “Role of alveolar macrophages during pulmonary infection with *Aspergillus fumigatus*”
ZMB Lunch Seminar (2012, Essen)
- “Engineered probiotic bacteria for the treatment of solid tumors – Subproject report”
ProTumor Projektmeeting (2012, Braunschweig)
- “Engineered probiotic bacteria for the treatment of solid tumors – Subproject report”
ProTumor Projektmeeting (2012, Dresden)

Posterpräsentationen

- “Neutrophil infiltration after pulmonary infection with *Aspergillus fumigatus* – benefit or disadvantage”
Annual Meeting of German Society for Immunology (2014, Bonn)
- “The alveolar macrophage – indispensable cell type in the fight against *Aspergillus fumigatus*”
Forschungstag der medizinischen Fakultät (2013, Essen)
- “The alveolar macrophage – indispensable cell type in the fight against *Aspergillus fumigatus*”
Annual Meeting of German Society for Immunology (2013, Mainz)
- “The alveolar macrophage – indispensable cell type in the fight against *Aspergillus fumigatus*”
Forschungstag der medizinischen Fakultät (2012, Essen)
- “Role of alveolar macrophages after pulmonary infection with *Aspergillus fumigatus*”
Forschungstag der medizinischen Fakultät (2011, Essen)

Abkürzungsverzeichnis

°C Grad Celsius

µg Mikrogramm

µl Mikroliter

µm Mikrometer

A

α anti

Abb. Abbildung

ADCC antibody-dependent cell-mediated toxicity

ADP Adenosindiphosphat

AK Antikörper

ALI acute lung injury

AM Alveolar Makrophage

APC antigen presenting cell

APC Allophycocyanin

ATCC American Type Culture Collection

AV Atrioventrikular

B

BAL bronchioalveoläre Lavage

Bsp. Beispiel

BV Mitralklappe

bzgl. Bezüglich

bzw. beziehungsweise

C

C1 Komplementfaktor 1

CBA cytometric bead array

CD Cluster of differentiation

CD11c Integrin αX

CFU Colony forming Unit

CLR C-Typ Lektinrezeptor

CT Computertomographie

CXCR C-X-C-motiv Rezeptor

CXCL C-X-C-motiv Ligand

D

d.h. das heißt

DAMP damage-associated molecular pattern

DC dendritic cell

deion. deionisiert

dest. Destilliert

DNA Deoxyribonucleic acid

DTR Diphtherietoxin Rezeptor

DTX Diphtherietoxin

E

EDTA Ethylendiamintetraacetat

EF-2 Elongationsfaktor 2

EGF	epidermal growth factor
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELMI	Elektronenmikroskop
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell

F

FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fc	fragment crystallisable
FCS	fetal calf serum
FDR	false discovery rate
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter

G

g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GFP	green fluorescent protein

H

h	Stunde
H&E	Hämatoxylin & Eosin

HB-EGF	heparin-binding EGF-like growth factor
--------	--

HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
-------	---

I

i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IA	Invasive Aspergillose
ICAM	intercellular adhesion molecule
i.d.R.	in der Regel
IFI	invasive fungal infection
IFN	Interferon
IL	Interleukin

K

KM	Knochenmark
KC	keratinocyte derived chemokine
kDa	Kilodalton
k.o.	knock out

L

l	Liter
LA	linkes Atrium
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid

LQP3 Long-QT-Syndrom Typ 3

LV linker Ventrikel

M

M Molar

MAC membrane attack complex

MACS magnetic activated cell sorting

MHC major histocompatibility
complex

min Minute

MIP-2 macrophage inflammatory
protein 2-alpha

mg Milligramm

ml Milliliter

mM Millimolar

MP Megapixel

MyD88 Myeloid differentiation primary
response gene 88**N**

ng Nanogramm

NADPH Nikotinsäureamid-Adenin-
Dinukleotid-Phosphat

NEAA non-essential amino acids

NETs neutrophil extracellular traps

NLR nucleotide-binding
oligomerization domain like
receptors**O**

o.g. oben genannt

PPAMP Pathogen Associated
Molecular PatternsPCCD progressive cardiac conduction
disease

PE Phyco-Erythrin

PEEP positive end-expiration
pressure

PBS phosphate buffered saline

pH negativer dekadischer
Logarithmus der
ProtonenkonzentrationPMA Phorbol 12-myristate 13-
acetatePMN Polymorphonukleäre
Leukozyten

PRR Pattern Recognition Receptor

R

RA rechtes Atrium

rcf round centrifugal force

REM Rasterelektronenmikroskop

ROS reactive oxygen species

RT Raumtemperatur

RV rechter Ventrikel

S

s	Sekunde
sCMOS	scientific complementary metal-oxid-semiconductor
SDF-1	stroma cell-derived factor
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SSC	side scatter

T

Tab.	Tabelle
TG	transgen
TGF- β	transforming growth factor beta
TIR	Toll/IL-1R homology domain
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha

TV

Trikuspidalklappe

U

u.U.	unter Umständen
u.g.	unten genannt

V

V	Volt
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VLA	very late antigen

W

WT	Wildtyp
----	---------

Z

z.B.	zum Beispiel
------	--------------

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Mechanismen der Antikörperdepletion	6
Abbildung 2-2: Strukturformel von Clodronat	7
Abbildung 2-3: Clodronat Liposomen.....	8
Abbildung 2-4: Aufnahme von Clodronat Liposomen in die Zelle.....	9
Abbildung 2-5: Aufnahme von Diphtherietoxin	10
Abbildung 2-6: Anatomie des respiratorischen Systems	13
Abbildung 2-7: Aufbau der Alveolen	14
Abbildung 2-8: Aufbau der Lunge in der Maus	15
Abbildung 2-9: zelluläre Lokalisation von TLRs	17
Abbildung 2-10: Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen.....	18
Abbildung 2-11: Mechanismen von Neutrophilen Granulozyten	19
Abbildung 2-12: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Aspergillus fumigatus</i>	23
Abbildung 2-13: Keimstadien von <i>Aspergillus fumigatus</i>	23
Abbildung 2-14: asexueller Lebenszyklus von <i>Aspergillus fumigatus</i>	24
Abbildung 2-15: Aufbau und Reizweiterleitung des Herzens.....	28
Abbildung 2-16: Elektrokardiogramm	29
Abbildung 2-17: EKG von Mensch und Maus	30
Abbildung 2-18: Elektrokardiogramm des Brugada-Syndroms Typ 1-3.....	31
Abbildung 3-1: Vevo 2100 Imaging Station (VisualSonics).....	52
Abbildung 3-2: <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA)	57
Abbildung 3-3: Funktionsprinzip Lichtblattmikroskopie	61
Abbildung 4-1: Überlebensrate nach AM-Depletion und Infektion mit <i>Aspergillus fumigatus</i>	64
Abbildung 4-2: Rekrutierung von NΦ nach steriler i.t. KC/MIP-2 Behandlung.....	66
Abbildung 4-3: Überlebensrate nach Depletion und steriler Inflammation	67
Abbildung 4-4: Durchflusszytometrische Analyse von ROS	68
Abbildung 4-5: Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) nach Depletion	69
und steriler Inflammation	69
Abbildung 4-6: Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) nach Depletion und	70
Infektion mit <i>Aspergillus fumigatus</i>	70
Abbildung 4-7: Analyse der Zytokinlevel in der Lunge nach AM Depletion und	71
Infektion mit <i>Aspergillus fumigatus</i>	71
Abbildung 4-8: Analyse der Zytokinmenge in der Lunge nach Depletion und	72
Infektion mit <i>Aspergillus fumigatus</i> - IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A und IFNγ	72
Abbildung 4-9: Analyse der Zytokinmenge in der Lunge nach Depletion und	73
Infektion mit <i>Aspergillus fumigatus</i> – TNFα und IL-6.....	73
Abbildung 4-10: Durchflusszytometrische Analyse der BAL nach Zelldepletion und	75
Infektion mit <i>Aspergillus fumigatus</i>	75
Abbildung 4-11: Eosinophile in der BAL nach AM Depletion und Infektion	76
mit <i>Aspergillus fumigatus</i>	76
Abbildung 4-12: Eosinophile in der BAL nach anti-IL-5 Behandlung	77
Abbildung 4-13: Überlebens- und Gewichtskurve nach anti-IL-5 Behandlung und	78
Infektion mit <i>Aspergillus fumigatus</i>	78
Abbildung 4-14: Rekrutierung von Eosinophilen nach intratrachealer Eotaxin-2 Applikation	79

Abbildung 4-15: Überlebenskurve nach AM Depletion mit 100 ng DTX.....	80
Abbildung 4-16: Lungenfunktionstest nach Behandlung mit DTX	82
Abbildung 4-17: H&E Färbung von histologischen Lungenpräparaten - Übersicht	84
Abbildung 4-18: H&E Färbung von histologischen Lungenpräparaten (20 x)	85
Abbildung 4-19: H&E Färbung von histologischen Lungenpräparaten (100 x)	86
Abbildung 4-20: REM Aufnahme der Lunge 48 h nach AM Depletion – 900 x	87
Abbildung 4-21: REM Aufnahme der Lunge 48 h nach AM Depletion – 2000 x	88
Abbildung 4-22: REM Aufnahme der Lunge 48 h nach AM Depletion – 2500 x	89
Abbildung 4-23: Blutbild nach AM Depletion durch DTX Gabe.....	90
Abbildung 4-24: Quantifizierung der Leukozyten im Blut nach Behandlung mit DTX	91
Abbildung 4-25: Blutgasanalyse nach Behandlung mit DTX.....	92
Abbildung 4-26: Blutgasanalyse nach Behandlung mit DTX.....	94
Abbildung 4-27: Histologische Präparate (H&E) des Herzmuskels nach Behandlung mit DTX.....	96
Abbildung 4-28: CD11cDTR Herzmuskel nach Behandlung mit DTX.....	97
Abbildung 4-29: Schweregrad der Myokardinfiltration nach Behandlung mit DTX.....	98
Abbildung 4-30: Infiltrierende Zellen im Herzmuskel nach Behandlung mit DTX.....	99
Abbildung 4-31: Infiltrierende Zellen im Herzmuskel nach Behandlung mit DTX.....	101
Abbildung 4-32: Überlebenskurve nach Depletion mit DTX sowie NΦ Depletion.....	102
Abbildung 4-33: NΦ Depletion prior DTX Behandlung	103
Abbildung 4-34: Überlebenskurve von CD11cDTR Tieren nach Depletion verschiedener Zellen.....	104
Abbildung 4-35: Verteilung von CD45 positiven Zellen im Herzmuskels nach Behandlung mit DTX – 2D.....	105
Abbildung 4-36: Verteilung von CD45 positiven Zellen im Herzmuskel nach Behandlung mit PBS – 3D Intensitätsverteilung.....	106
Abbildung 4-37: Verteilung von CD45 positiven Zellen im Herzmuskel nach Behandlung mit PBS – 3D Intensitätsverteilung.....	107
Abbildung 4-38: Verteilung von CD45 positiven Zellen im Herzmuskel nach Behandlung mit DTX – 3D Intensitätsverteilung	108
Abbildung 4-39: Repräsentative EKG Aufnahmen <i>in vivo</i> nach Behandlung mit DTX.....	109
Abbildung 4-40: Auszug der EKGs nach Depletion mit DTX	110
Abbildung 4-41: Atemfrequenz <i>in vivo</i> nach Depletion mit DTX.....	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben	33
Tabelle 3-2: Verwendete Geräte mit Herstellerangaben	36
Tabelle 3-3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	37
Tabelle 3-4: Verwendete Kits	44
Tabelle 3-5: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie/ <i>in vivo</i>	44
Tabelle 3-6: Verwendete Depletionsantikörper.....	46
Tabelle 3-7: Übersicht über verwendete Pilzstämme	46
Tabelle 3-8: Inkubationszeiten und Lösungen bei automatisierter Trocknung	59
Tabelle 4-1: Verwendete Antikörperkombinationen für die Analyse der BAL nach Depletion und Infektion mit <i>Aspergillus fumigatus</i>	74
Tabelle 4-2: Gruppeneinteilung neues DTX.....	80

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis.....	X
1. Inhaltsangabe	1
2. Einleitung.....	4
2.1 Zelluläre Depletionsmechanismen	4
2.1.1 <i>knock-out</i> Mäuse	4
2.1.2 Antikörper-vermittelte Zelldepletion	5
2.1.3 Depletion mit Clodronat Liposomen	7
2.1.4 Depletion über Diphtherietoxin (DTX)	9
2.2 CD11cDTR Maus	11
2.3 Lunge	12
2.3.1 Die Immunabwehr in der Lunge	15
2.4 <i>Aspergillus fumigatus</i>	21
2.4.1 Vorkommen und Vermehrung	22
2.4.2 Pathogenität von <i>Aspergillus fumigatus</i>	24
2.4.3 Das Immunsystem der Lunge bei der Abwehr von <i>Aspergillus fumigatus</i>	26
2.5 Funktion des Herzens	27
2.6 Zielstellung	31
3. Material und Methoden	33
3.1 Materialien	33
3.1.1 Verbrauchsmaterial	33
3.1.2 Geräte.....	36
3.2 Chemikalien und Puffer	37
3.2.1 Puffer:.....	40
3.2.2 Mikrobiologische Nährmedien	42
3.2.3 Material - Molekularbiologische Methoden	44
3.2.4 Material - Immunologische Methoden	44
3.3 <i>Aspergillus fumigatus</i> Stämme.....	46
3.4 Versuchstiere.....	46
3.5 Allgemeine Methoden.....	47
3.5.1 Kultivierung von <i>Aspergillus fumigatus</i>	47
3.5.2 Mausearbeiten	47
3.5.3 Probengewinnung	52

3.5.4	Analytische Verfahren	55
3.5.5	Probenaufbereitung für die Lichtblattmikroskopie.....	60
3.5.6	Probenaufbereitung für die Rasterelektronenmikroskop (REM)	62
4.	Ergebnisse	64
4.1	Charakterisierung der Neutrophilenantwort	64
4.1.1	Sterile Inflammation - chemotaktische Rekrutierung	65
4.1.2	Reaktive Sauerstoffspezies nach Depletion	67
4.1.3	Pro- und Anti-inflammatorische Zytokine	70
4.2	Fehlende regulatorische Zellen nach Depletion und Infektion	74
4.2.1	Blockierung einer Eosinophilenrekrutierung durch anti-IL-5 Antikörper	
	Behandlung.....	76
4.2.2	Rekrutierung von Eosinophilen über Eotaxin 2 (CCL24).....	78
4.3	Analyse der DTX Behandlung als Auslöser der Mortalität in CD11cDTR Mäusen	79
4.4	<i>in vivo</i> Lungenfunktionstests	81
4.5	Strukturelle Unterschiede in der Lunge – histologische Analyse	83
4.6	Strukturelle Unterschiede in der Lunge – hochauflösende Analyse	86
4.7	Blutbild nach AM Depletion	90
4.8	Blutgasanalyse nach AM Depletion.....	91
4.9	Effekte der DTX Applikation auf den Herzmuskel	95
4.9.1	Histologische Analyse des Herzmuskels	95
4.9.2	Analyse der infiltrierenden Zellen im Herzmuskel	99
4.9.3	Depletion von Makrophagen und Neutrophilen	101
4.9.4	Zelltod in CD11cDTR Mäusen	103
4.9.5	Verteilung von CD45 positiven Zellen im Herzmuskel	104
4.9.6	Elektrokardiogramme nach Depletion mit DTX.....	109
5.	Diskussion.....	112
5.1	Immunreaktion nach DTX Behandlung und Infektion	113
5.2	Einfluss von eosinophilen Granulozyten auf die Überlebensrate DTX-behandelter	
	CD11cDTR Tiere	115
5.3	Letale Wirkung bei einmaliger DTX Behandlung	116
5.4	Eine Behandlung mit DTX verursacht Blut-Neutrophilie und Azidose in	
	CD11cDTR Tieren	117
5.5	Die Applikation von DTX induziert eine letale Infiltration des Myokards durch Störung	
	der kardialen Reizweiterleitung im CD11cDTR Modell	118

5.6	Kontroverse Ergebnisse in der Literatur.....	125
5.7	Alternative Mausmodelle.....	127
5.8	Alternative Nutzung der CD11cDTR Maus	128
5.9	Fazit	129
6.	Ausblick	130
7.	Referenzen	132
7.1	Internetquellen.....	132
7.2	Referenzliste.....	132
8.	Anlagen.....	142
8.1	Danksagung	142
8.2	Lebenslauf	144
8.3	Erklärungen	148

1. Inhaltsangabe

Die Untersuchung immunologischer Funktionen auf Zellebene erfolgt häufig über die Verwendung transgener Mauslinien, die es ermöglichen gezielt Zellsorten kurzzeitig oder dauerhaft zu eliminieren und ihren Einfluss dann bei bestimmten immunologischen Vorgängen zu untersuchen. Neben den konventionellen *knock-out* Mäusen gibt es die Möglichkeit Zellen über das Einbringen eines Primaten-Diphtherietoxinrezeptors, der sich durch eine höhere Affinität zum Diphtherietoxin (DTX) als der endogene Mausrezeptor auszeichnet, spezifisch zu entfernen. Dabei steht der exogene Rezeptor unter der Kontrolle eines zelltypspezifischen Promotors, wobei die Applikation des Toxins zum Zelltod der rezeptortragenden Zellen führt.

Eine dieser transgenen Mauslinien ist die CD11cDTR Maus, bei der CD11c positive Zellen, wie dendritische Zellen oder Alveolarmakrophagen, durch die Gabe von Diphtherietoxin depletiert werden können. Bei Untersuchungen zur Rolle der Alveolarmakrophagen während einer pulmonalen Infektion mit dem humanpathogenen Pilz *Aspergillus fumigatus* in diesem Modell fiel auf, dass allein die lokale Applikation des Toxins in die Lunge letal war. Durch weitere Versuche hierzu konnte gezeigt werden, dass die letale Wirkung weder durch eine Unterfunktion der Lunge, noch eine erhöhte Pilzlast in der Lunge zu erklären war. Vielmehr wurde demonstriert, dass es zu einer massiven Infiltration von Immunzellen in den Herzmuskel kam, wobei besonders Bereiche, die sich für die Reizweiterleitung verantwortlich zeigten, betroffen schienen. Diese Infiltration durch Leukozyten verursachte zusätzlich schwere Schäden im Herzgewebe und beeinflusste die Repolarisation der Ventrikel während der Erregungsleitung.

Zusammengenommen zeigten die Ergebnisse eine spontane, durch Diphtherietoxin induzierte Myokardinfiltration in diesem Modell, die neben schweren Schäden im Herzgewebe zum Tod der Tiere führte. Seit der Originalpublikation zu dieser Mauslinie, die bereits über 1000 Mal zitiert wurde, beobachteten etliche weitere Studien bei Nutzung dieses Modells, eine fehlende Monozytenpopulation im Zusammenhang mit einer Grunderkrankung, welche sie für eine erhöhte Mortalität verantwortlich machten. Unter Berücksichtigung der hier gewonnen Erkenntnisse müssen diese Publikationen ggf. kritisch betrachtet werden, da die Mortalität möglicherweise nicht im Zusammenhang mit der untersuchten Grunderkrankung

stand, sondern durch die DTX Applikation ausgelöst wurde. Nichts desto trotz bietet dieses Mausmodell die Möglichkeit als induzierbares Modell für die Infiltration des Myokards zu dienen, wobei die Klärung der mechanistischen Hintergründe neue Erkenntnisse in Bezug auf Erkrankungen des Myokards liefern könnten.

Abstract

For the characterization of individual cell functions during immunological processes a standard approach is the employment of transgenic mice, which allow an induced depletion of the cell subset of interest. One model for such a conditional cell ablation uses diphtheria toxin (DTX). Animals express the primate diphtheria toxin receptor (DTR), which is characterized by a far stronger affinity to DTX than the murine DTR, under control of a cell type-specific promoter. A DTX challenge of these mice leads to an exclusive death of the primate DTR-expressing cells.

A frequently used murine DTR model is the CD11cDTR mouse in which CD11c positive cells, e.g. dendritic cells and macrophage subsets, can be depleted by administration of the toxin. This study employed the CD11cDTR mouse to deeply analyze the function of alveolar macrophages during pulmonary infection with the facultative human pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. To our surprise, a 100 % lethality could be induced in these mice by i.t. DTX treatment, even without an additional fungal infection. Further investigations revealed that this effect could be linked neither to a defect in pulmonary function nor to an inhibited fungal clearance from the lung. However, a massive cardiac infiltration with leukocytes was found. This infiltration was highly abundant in areas responsible for cardiac conduction and probably led to severe myocardial cell damage, which in turn affected the repolarization of the ventricles in the cardiac cycle.

Taken together these findings revealed a spontaneously induced myocardial cell destruction after a single diphtheria toxin treatment, which ultimately led to the animal's death. Among >1.000 citations referring to the original publication of the CD11cDTR mouse many studies have described elevated mortality rates as consequence of a missing monocytic cell population in a particular disease model. All these manuscripts are now put under suspicion, as the major cause of death was possibly the DTX induced myocarditis. Nevertheless, these mice also harbor the opportunity to serve as an animal model of inducible myocardial infiltration and by examination of the underlying mechanisms possibly a better understanding of the illness can be achieved.

2. Einleitung

Seit Jahren werden Methoden der genetischen Manipulation von Tieren angewandt, um biologische Vorgänge zu untersuchen. Dabei kann der Einfluss von einzelnen Proteinen durch gezieltes Ausschalten in komplexen Abläufen im Organismus untersucht werden. Doch nicht nur Proteine werden hierbei untersucht, auch ganze Zellarten können manipuliert werden, um die Auswirkungen bei unterdrückter oder gestörter Funktion *in vivo* zu beschreiben.

Die Maus als Modellorganismus, speziell im immunologischen Bereich, bietet hierbei vielfältige Möglichkeiten um funktionelle Prozesse zu beleuchten. Dabei wurden in der Vergangenheit diverse Verfahren entwickelt, die, angefangen beim genetischen *knock-out* einer definierten, codierenden Sequenz, bis hin zur partiellen, zeitlich begrenzten Depletion von Genen oder Zelltypen reichen.

2.1 Zelluläre Depletionsmechanismen

2.1.1 *knock-out* Mäuse

Für die Untersuchung von Zellfunktionen im Organismus gibt es zahlreiche sogenannte *knock-out* Mäuse, bei denen einzelne codierende Sequenzen gentechnisch deaktiviert wurden. Die Deletion der einzelnen Gene führt dabei zum Fehlen von Proteinen, die wiederum das Fehlen ganzer Zellen bis hin zu Organen auslösen können, wie beispielsweise in der als „Nacktmaus“ bekannten *knock-out* Maus (Flanagan, 1966). Hierbei kam es zu einer spontanen Mutation im *Foxn1^{nu}* Gen, was zur Folge hatte, dass homozygote Tiere dieser Linie eine Thymusaplasie (Fehlen des Thymus) und damit ein Fehlen von T-Lymphozyten aufwiesen. Ein weiterer Effekt der Genmutation war das Fehlen von Haaren, was dieser Linie ihren Namen einbrachte. Neben diesen spontan auftretenden Mutationen können aber auch gezielt Sequenzen über die Transfektion embryonaler Stammzellen (Bouabe & Okkenhaug, 2013) oder durch die Nutzung retroviraler Vektoren manipuliert werden (Howarth *et al.*, 2010). Zu beachten ist allerdings, dass nicht für jede Zelle oder jedes Protein eine *knock-out* Maus generiert werden kann, da die Manipulation ggf. letale Auswirkungen hat. Aus diesem Grund gibt es weitere Mechanismen die eine induzierte Depletion von Genen und Zellen ermöglichen.

2.1.2 Antikörper-vermittelte Zelldepletion

Zu diesen induzierten Zelldepletionsmechanismen gehört die Depletion über zellspezifische Antikörper. Die Wirkungsweise der eingesetzten Antikörper ist nicht in allen Fällen vollständig verstanden, lässt sich aber weitestgehend in drei verschiedene Wirkmechanismen unterteilen. Die Mechanismen werden hier am Beispiel des depletierenden Antikörpers anti-CD20 (Rituximab) erläutert (Maloney, 2012), der in therapeutischen Verfahren zur Behandlung maligner B-Zell-Lymphome verwendet wird (Bello & Sotomayor, 2007). Zunächst gibt es dabei den Mechanismus der komplementvermittelten Lyse (Abb. 2-1), bei der der Antikörper, nach Bindung an das Oberflächenmolekül CD20, zusätzlich mit seinem Fc-Teil an den Komplementfaktor C1 bindet. Diese Bindung löst die Komplementkaskade aus, an deren Ende die Zelllyse durch Bildung des Membranangriffskomplexes (*membrane attack complex* – MAC, siehe Abb. 2-1) steht (Kochi *et al.*, 1991; Nauta *et al.*, 2002).

Ein weiterer Mechanismus ist die antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* – ADCC), bei der nach Bindung des anti-CD20 Antikörpers an die Zielzelle sogenannte Effektorzellen (bspw. NK-Zellen, Makrophagen) mit ihren Fcγ-Rezeptoren den FC-Teil des anti-CD20 Antikörpers erkennen und binden (Borregaard & Kragballe, 1980; Fuson *et al.*, 1983; Seidel *et al.*, 2013). Diese Bindung löst in den Effektorzellen die Freisetzung von Effektormolekülen (z.B. Perforinen) aus, was wiederum zur Zelllyse der Zielzelle führt. Bei dem dritten Wirkmechanismus hingegen führt die Bindung des Antikörpers direkt zu einem Effekt, indem die Bindung an den Rezeptor antiproliferative Signale in der Zelle, Apoptose oder die Inhibierung des Zellwachstums auslöst (Ludwig *et al.*, 2003).

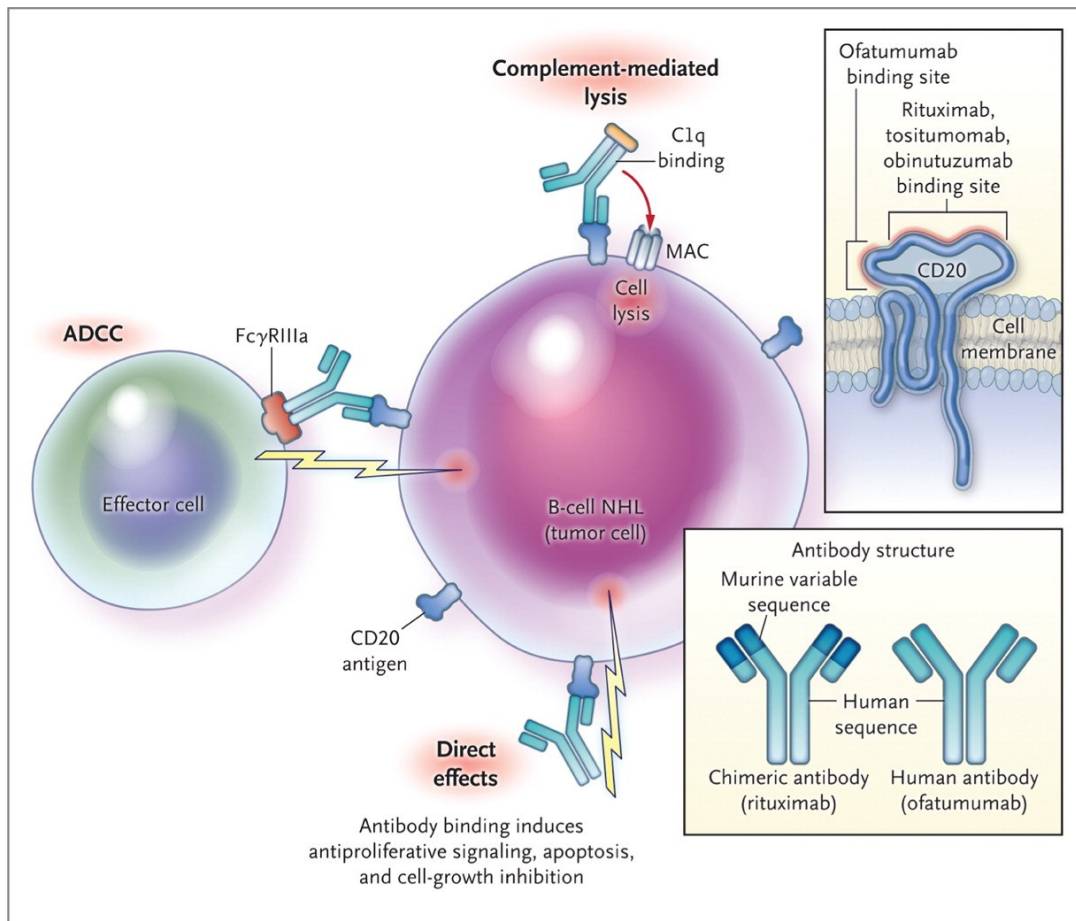


Abbildung 2-1: Mechanismen der Antikörperperdepletion

Um den antikörpervermittelten Zelltod auszulösen sind drei unterschiedliche Mechanismen postuliert. Zum einen induziert, neben der Antikörperbindung, die zusätzliche Bindung des Fc-Teils des Antikörpers an den Komplementfaktor C1 (oben) die Komplementkaskade und damit die Lyse der Zelle. Ein weiterer Mechanismus beschreibt die Bindung von Effektorzellen (links), ebenfalls an den Fc-Teil des Antikörpers, woraufhin Effektormoleküle freigesetzt werden und den Zelltod der Zielzelle verursachen. Als dritter Mechanismus ist die direkte Wirkung der Antikörperbindung beschrieben, die in der Zelle antiproliferative oder apoptotische Signale auslösen kann. (Maloney, 2012)

2.1.3 Depletion mit Clodronat Liposomen

Ein weiteres Modell zur induzierten Depletion von Zellen ist die Eliminierung von Makrophagen mittels Clodronat Liposomen. Es handelt sich hierbei um ein kommerziell erhältliches Produkt, welches erstmals 1984 durch den Entwickler Nico van Rooijen beschrieben wurde (van Rooijen & van Nieuwmegen, 1984). Clodronat (Abb. 2-2) gehört zur Gruppe der Biphosphonate, also chemischen Verbindungen mit zwei Phosphatgruppen, die in der Medizin zur Behandlung von Knochenerkrankungen wie Osteoporose (Fleisch, 2000) verwendet werden.

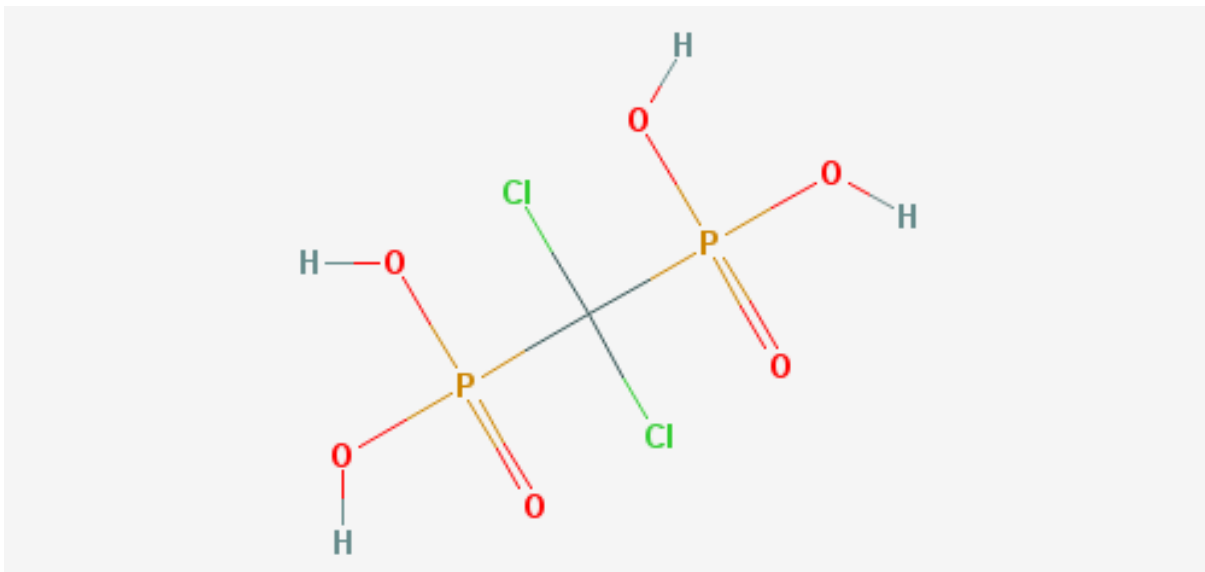


Abbildung 2-2: Strukturformel von Clodronat

Die Strukturformel von Clodronat zeigt die zwei Phosphatgruppen (beige, rot) die zusammen mit zwei Chloridionen (grün) um ein zentrales Kohlenstoffatom (grau, Mitte) gelagert sind. ¹⁰⁰¹

Eine erhöhte Menge an Clodronat innerhalb einer Zelle führt zu irreversiblen Schäden und zur Apoptose der Zelle (van Rooijen *et al.*, 1996), wobei das Biphosphonat in seiner ursprünglich Form nicht in der Lage ist in die Zelle einzudringen. Um sich die toxische Wirkung nach Akkumulation in der Zelle zunutze zu machen, wurde das Clodronat in eine Phospholipidschicht verpackt (Abb. 2-3). Dabei liegt das Clodronat in wässriger Lösung zwischen kugelförmigen Strukturen aus Lipiddoppelschichten vor, die nachfolgend als Clodronat Liposomen bezeichnet werden.

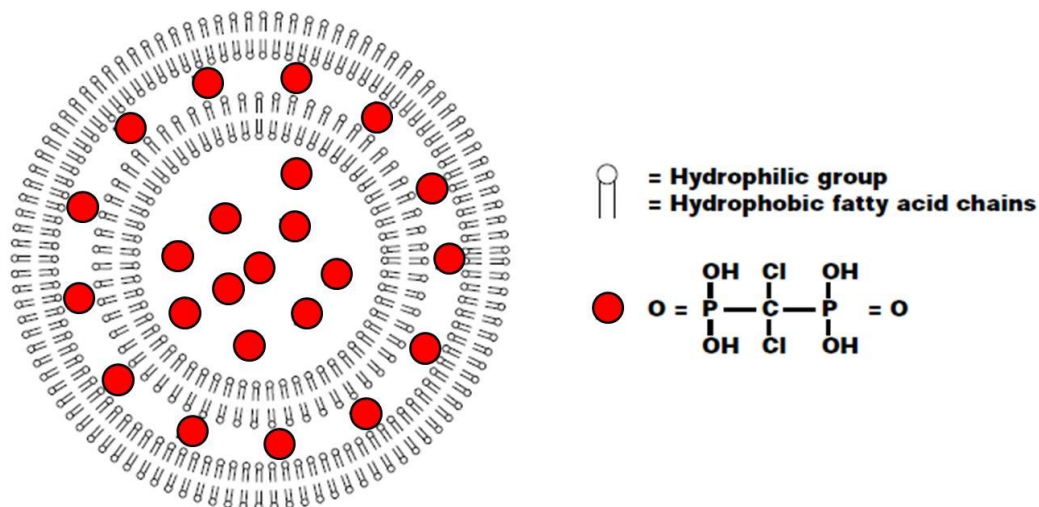


Abbildung 2-3: Clodronat Liposomen

Zwischen zwei Phospholipid Doppelschichten befindet sich das in wässriger Lösung vorliegende Clodronat (rot). Diese artifiziellen Sphären formieren sich, wenn Phospholipide zusammen mit gelöstem Clodronat in wässriger Lösung zusammengebracht werden. ¹⁰⁰²

Diese Liposomen können nun von phagozytierenden Zellen aufgenommen werden (Abb. 2-4), wobei die Lipidschicht durch lysosomale Phospholipasen zerstört und das Clodronat in die Zelle freigesetzt wird. Da das Biphosphonat die Zelle nicht wieder verlassen kann, akkumuliert es im Zytoplasma und führt nach Erreichen eines bestimmten Schwellwertes zur Apoptose der Zelle (Van Rooijen, 1989).

Für die Depletion von Makrophagen mit Clodronat Liposomen müssen diese demnach in direkten Kontakt mit den Liposomen treten. Dies erreicht man durch die Applikation im Zielgewebe, wobei vaskuläre Barrieren durch die Liposomen nicht durchdrungen werden können. Die Depletion von Alveolarmakrophagen erfolgt daher durch die Administration der Liposomen über die Trachea direkt in die Lunge, wobei eine Depletionseffizienz von rund 85 % erreicht werden kann (Untersuchungen der AG Gunzer).

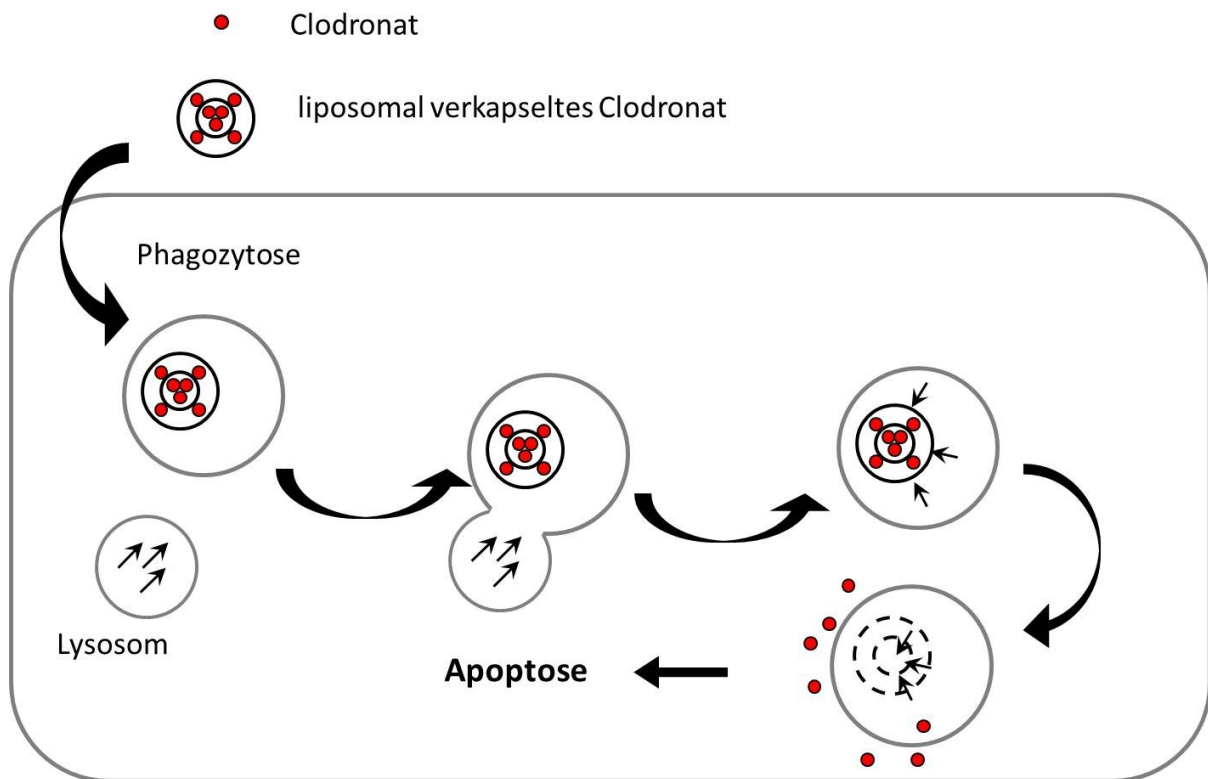


Abbildung 2-4: Aufnahme von Clodronat Liposomen in die Zelle

Durch die Phospholipidschicht der Liposomen können diese von phagozytierenden Zellen (graues Rechteck) aufgenommen werden. Im Zytoplasma verschmelzen die Liposomen mit dem Lysosom, wodurch Phospholipasen (Pfeile) die Lipidschicht der Liposomen zersetzen. Die so frei werdenden Clodronatmoleküle (rote Kreise) akkumulieren in der Zelle und führen nach Erreichen eines Schwellenwertes zur Apoptose.

2.1.4 Depletion über Diphtherietoxin (DTX)

Ein anderer Mechanismus zur Depletion von Zellen im gesamten Organismus ist die Behandlung über das Diphtherietoxin (DTX) (Saito *et al.*, 2001). Dabei wird in transgenen Tieren neben dem endogenen Rezeptor für DTX ein zusätzlicher, aus dem Affen oder Mensch stammender Diphtherietoxinrezeptor exprimiert. Diese zusätzliche Expression wird zumeist an einen, für die zu depletierende Zelle spezifischen Promotor gekoppelt, sodass lediglich die Zielzelle über den zusätzlichen Rezeptor verfügt. Der Unterschied zwischen dem endogenen Mausrezeptor und dem transgenen Rezeptor ist die Bindungsaffinität gegenüber dem Diphtherietoxin. Dabei besitzt der endogene Rezeptor lediglich eine geringe Affinität ($10^3 - 10^5$ Mal weniger) (Bennett & Clausen, 2007) zum Toxin (R-Untereinheit), wohingegen der transgene Rezeptor eine hohe Affinität aufweist. Dies hat zur Folge, dass nach Bindung des Toxins an den hochaffinen Rezeptor, schon bei sehr geringen Dosen von DTX der Zelltod ausgelöst wird.

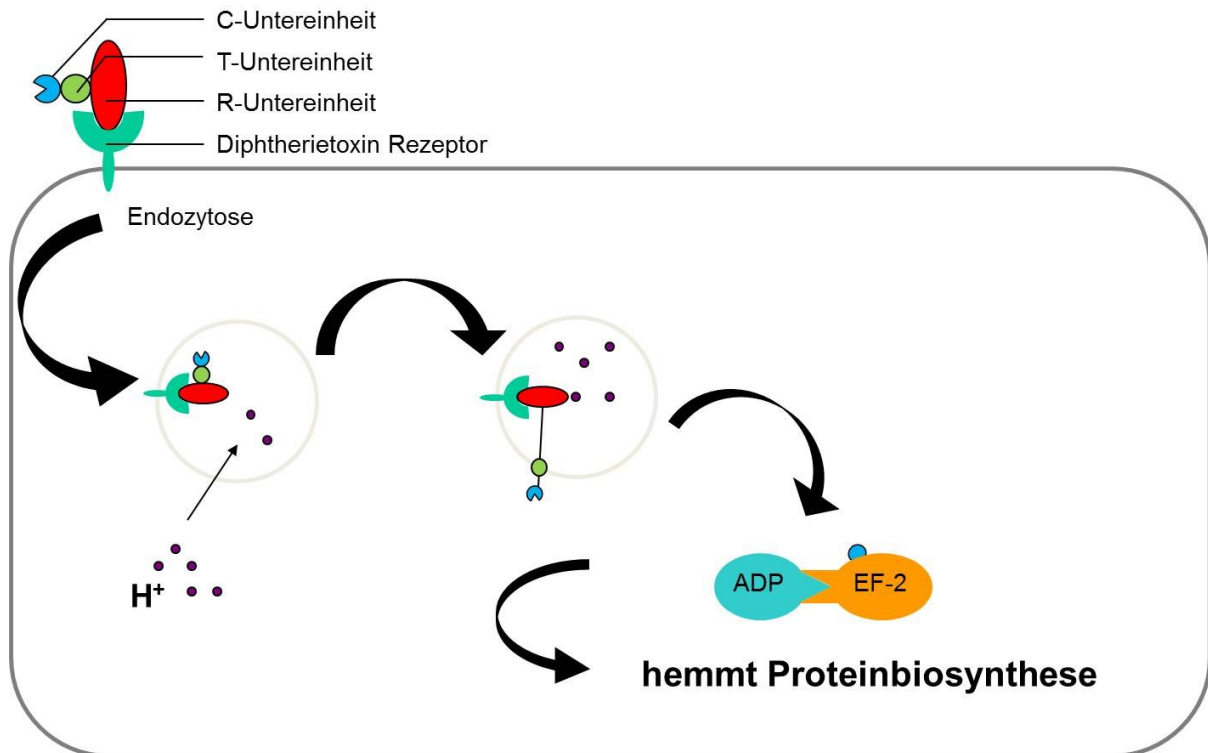


Abbildung 2-5: Aufnahme von Diphtherietoxin

Das aus drei Untereinheiten bestehende Diphtherietoxin wird nach der Bindung der R-Untereinheit (*receptor binding domain*) an den Rezeptor über Endozytose in die Zelle aufgenommen. Der Einstrom von Wasserstoffionen (lila Kreise) in das Endosom führt dabei zu einer Konformitätsänderung in der T-Untereinheit (*translocation domain*) woraufhin diese in die Membran des Endosoms integriert und dabei die C-Untereinheit (*catalytic domain*) in das Zytoplasma ausschleust. Die freie C-Untereinheit katalysiert daraufhin die ADP-Ribolysierung des Elongationsfaktors-2, dessen Funktion während der Proteinfaltung bei der Proteinbiosynthese daraufhin inhibiert wird. Die inkorrekte Faltung der Proteine führt nachfolgend zum Tod der Zelle.

Das Toxin selbst besteht aus drei Untereinheiten (Ladokhin, 2013) die über Peptid- und Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die R-Untereinheit (*receptor binding domain*) ist dabei für die Bindung an den Rezeptor verantwortlich, wobei der gesamte Komplex nach Bindung des Toxins über Endozytose in die Zelle aufgenommen wird (Abb. 2-5). Durch den Einstrom von Wasserstoffionen kommt es zu einer Konformitätsänderung in der T-Untereinheit (*translocation domain*), bei der diese Untereinheit in die Membran des Endosoms inseriert und die C-Untereinheit (*catalytic domain*) in das Zytoplasma ausschleust. Im Zytoplasma katalysiert die C-Untereinheit dann die ADP-Ribolysierung (Collier, 1975) des Elongationsfaktors 2 (EF-2, Abb. 2-5), was zu einer Inhibierung der Proteinfaltung während der Proteinbiosynthese führt. Dies hat unweigerlich den Tod der Zelle zur Folge.

Ein großer Vorteil dieser Methode ist die induzierbare, temporär begrenzte Depletion der Zielzelle, wobei die apoptotischen Zellen in der Theorie keine pro-inflammatorischen Signale auslösen (Bennett & Clausen, 2007).

2.2 CD11cDTR Maus

Um die Methode der Depletion durch Diphtherietoxin auch auf dendritische Zellen und Makrophagen zu übertragen, wurde im CD11cDTR Mausmodell (Jung *et al.*, 2002) der Primaten-Diphtherietoxinrezeptor unter Kontrolle des CD11c Promotors gestellt. Zusätzlich wurde der Rezeptor mit einem grünen Fluoreszenzprotein (*green fluorescence protein* – GFP) fusioniert. CD11c, auch bekannt als Integrin αX oder p150 (nach der Molekülmasse von 150 kDa), ist ein Glykoprotein, welches von dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und Subpopulationen von T-Lymphozyten präsentiert wird (Sadhu *et al.*, 2007). Es handelt sich dabei um ein Transmembranprotein, das zur Familie der Integrine gehört (Stewart *et al.*, 1995). Ebenso wie CD11a, CD11b und CD11d, bildet CD11c als alpha Untereinheit zusammen mit der beta Untereinheit CD18 (p95) einen heterodimeren Komplex, der für Zell-Zell-Interaktionen verantwortlich ist, und spielt eine Rolle bei der Bindung von Monozyten an Adhäsionsmoleküle wie das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (*intercellular adhesion molecule 1* - ICAM-1) oder ICAM-4 auf dem Endothel. Zusätzlich bindet CD11c ein breites Spektrum an Liganden wie Komplementfaktoren (iC3b), Matrixproteine (Fibrinogen) und bakterielle Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharid (LPS) und wird in diversen Prozessen wie der Phagozytose, Zellmigration, Zytokinproduktion und Induktion der T-Zell Proliferation beschrieben (Sadhu *et al.*, 2007).

Obwohl CD11c in geringem Maß auch auf Neutrophilen und anderen Zellen exprimiert wird, gilt es durch die hohe Expression auf dendritischen Zellen und Makrophagen als Marker für diese.

In der CD11cDTR Maus wurde das gesamte Fragment, bestehend aus dem zusätzlichen Rezeptor und dem GFP, nach der Amplifizierung über Polymerasekettenreaktion isoliert und durch Mikroinjektion in die Vorkerne befruchteter Oozyten von FVB/N Mäusen¹⁰⁰³ injiziert (Taketo *et al.*, 1991). Die transgenen Nachkommen wurden über Southernblot identifiziert und in mehreren Rückkreuzungen auf den genetischen Hintergrund von C57/BL6 sowie BALB/c

Mäusen gebracht. Die i.p. Applikation von 100 ng Toxin verursachte innerhalb von 24 h eine Reduktion von dendritischen Zellen in der Milz, die sich erst nach 6 Tagen wieder vollständig regenerierte (Jung *et al.*, 2002). Ebenso wie dendritische Zellen können in diesem Modell einige Makrophagenpopulationen depletiert werden. Zu ihnen gehören beispielsweise die Alveolarmakrophagen (van Rijt *et al.*, 2005), sowie Makrophagen der Marginalzone und metallophile Makrophagen der Milz (Probst *et al.*, 2005).

Doch das Modell birgt auch einige Nachteile. So kann aufgrund des Generierungsprozesses nicht gesagt werden, an welcher Stelle im Genom das transgene Konstrukt inseriert hat. Dabei wurde bereits in der Originalpublikation zu dieser Linie beschrieben, dass zwischen 1 bis 20 Kopien (Jung *et al.*, 2002) inseriert haben. Ein weiterer Nachteil ist die immunologische Wirkung der DTX Applikation. Zwar sollte der Abbau der apoptotischen Zellen keinerlei pro-inflammatorische Reaktion hervorrufen, dennoch wurde bereits beschrieben, dass es nach einer Depletion zu deutlichen pro-inflammatorischen Prozessen kommt, die durch das Einströmen von Neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet waren (Tittel *et al.*, 2012).

2.3 Lunge

Eine der Verwendungsmöglichkeiten der CD11cDTR Maus ist die Untersuchung infektiöser oder asthmatischer Prozesse in der Lunge. Dabei können zwei der am häufigsten in der Lunge anzutreffenden Immunzellen erfolgreich depletiert werden.

Die Lunge ist nicht nur für den Gasaustausch bei der Atmung zuständig, sie ist auch ein Organ, welches durch diesen Gasaustausch im permanenten Kontakt mit der Umwelt steht. Doch neben Sauerstoff werden auch permanent Stäube und potentielle Pathogene eingeatmet (Hasenberg *et al.*, 2011; Murphy, 2012), die sich dann im respiratorischen Trakt wiederfinden lassen.

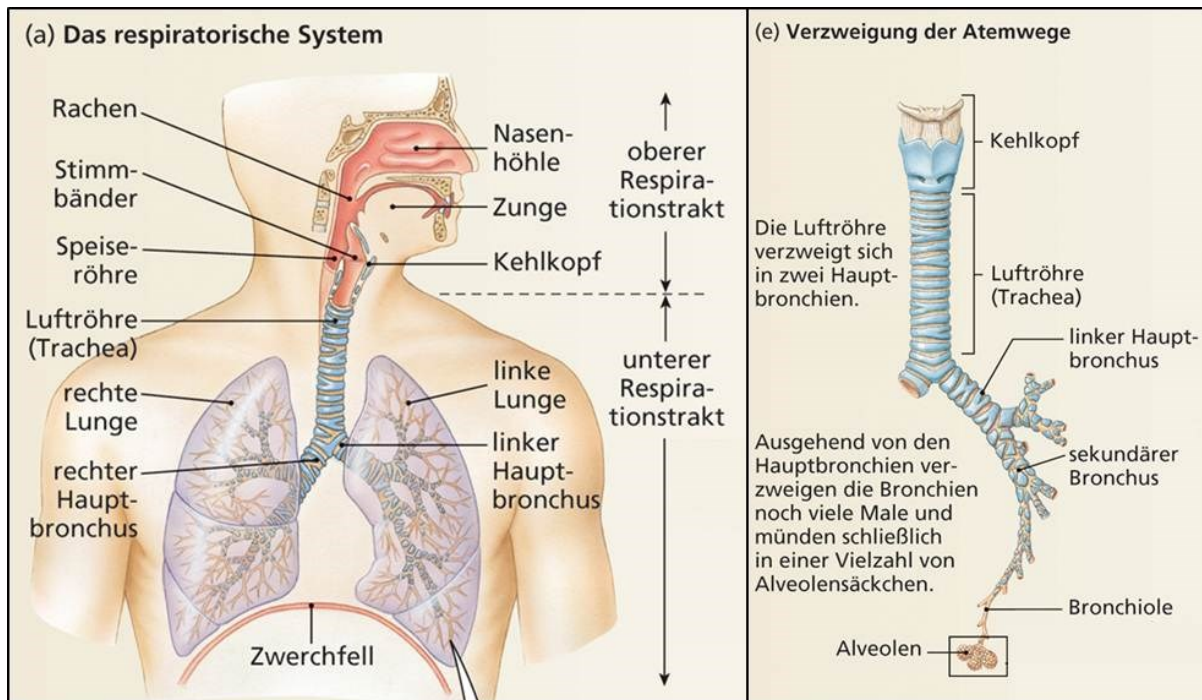


Abbildung 2-6: Anatomie des respiratorischen Systems

Den oberen Atemtrakt (links) im Kopfbereich bilden Nase und Nasennebenhöhlen, sowie der Mund- und Rachenraum. Der untere Atemtrakt besteht aus der Luftröhre (Trachea), den Bronchien und den rechts und links liegenden Lungenflügeln. Ausgehend vom Kehlkopf (rechts) verzweigt sich die Trachea zunächst an der Bifurkation in einen linken und einen rechten Hauptbronchus. Diese verzweigen sich weiter in immer kleinere, sich verjüngende Bronchien und münden schließlich in den Alveolen, in denen der Gasaustausch stattfindet. (Silverthorn & Weber, 2009)

Zu diesem respiratorischen Trakt (Abb. 2-6, links) gehören die oberen Atemwege, wozu die Nasennebenhöhlen und der Rachen zählen, sowie die unteren Atemwege denen die Luftröhre (Trachea), die Bronchien und Lungenlappen zugeordnet werden (Silverthorn & Weber, 2009). In der Detaillierten Ansicht (Abb. 2-6, rechts) wird deutlich, dass die Trachea sich an der Bifurkation in einen linken und einen rechten Hauptbronchus aufteilt. Von der Trachea ausgehend, verzweigen und verjüngen sich die Bronchien immer mehr, wobei an ihren Enden die kleinsten Kompartimente der Lunge, die Alveolen, stehen. In diesen Alveolen findet der eigentliche Gasaustausch statt (Silverthorn & Weber, 2009). Um die Lunge vor eindringenden Pathogenen zu schützen gibt es sowohl chemische, als auch mechanische Barrieren in den oberen Bereichen des respiratorischen Traktes. Zu ihnen gehören die Schleimhäute von Nase und Mund, sowie die Haare der Nase und die Zilien, Flimmerhärchen (Fahy & Dickey, 2010), die sich ausgehend von der Trachea bis in die kleineren Bronchien finden lassen.

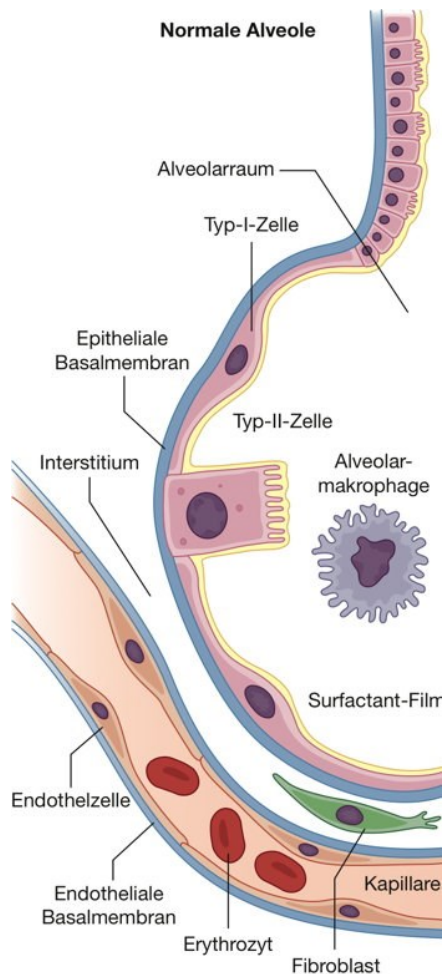


Abbildung 2-7: Aufbau der Alveolen

Der Aufbau der Alveolen besteht im Wesentlichen aus einer epithelialen Basalmembran, die zusammen mit Kollagen das Grundgerüst bildet und den Alveolen Stabilität verleiht. Auf der Luft zugewandten Seite sind die Alveolen zusätzlich mit Epithelzellen des Typ I ausgekleidet, wobei in geringerer Anzahl auch Typ II Zellen zu finden sind, deren Hauptaufgabe die Sekretion einer schützenden Phospholipidschicht (Surfactant) ist. Zusätzlich finden sich in den einzelnen Alveolen auch immunologisch relevante Zellen, die Alveolarmakrophagen. (Longo *et al.*, 2012)

Die Alveolen selbst bestehen primär aus einer formgebenden Basalmembran, der auf der luftzugewandten Seite die Epithelzellen des Typ I (Abb. 2-7) aufgelagert sind. Diese flachen, langgezogenen Zellen bedecken fast 95 % der Alveolen und sind nur gelegentlich von Epithelzellen des Typs II (Abb. 2-7) unterbrochen (Silverthorn & Weber, 2009). Im Gegensatz zum Typ I sind die Zellen des Typs II kompakter, fast würfelartig und produzieren das sogenannte Surfactant, ein Gemisch aus Phospholipiden, Proteinen und Ionen, welches die Oberflächenspannung mindert und so die Alveole vor dem Kollabieren schützen (Silverthorn & Weber, 2009). Zusätzlich wird dem Surfactant eine antimikrobielle Funktion nachgesagt (Wu *et al.*, 2003).

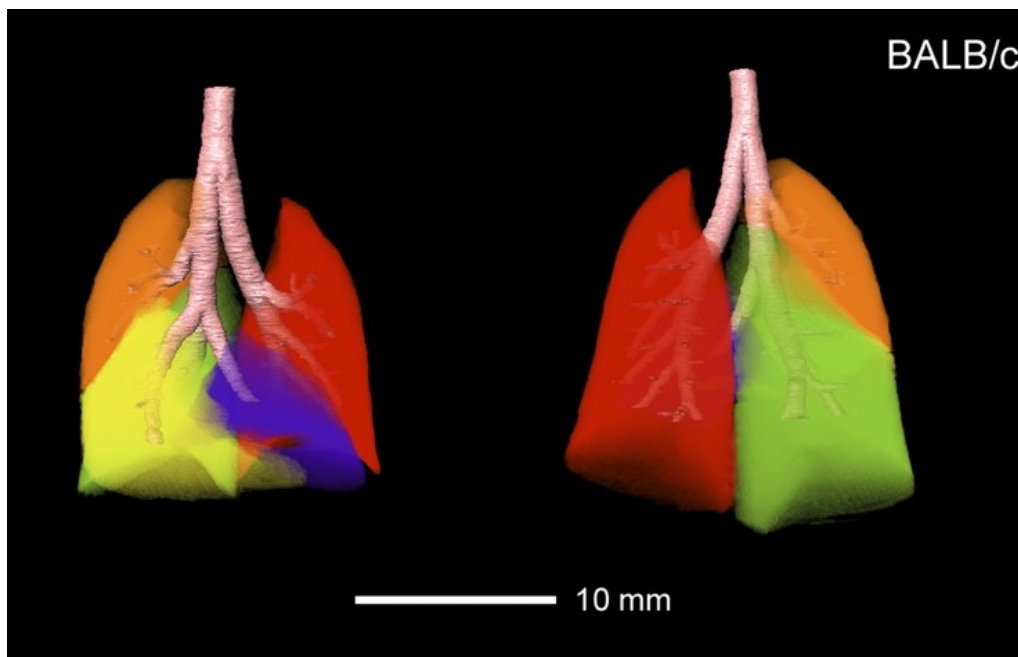


Abbildung 2-8: Aufbau der Lunge in der Maus

Die dreidimensionale Rekonstruktion von Mikro-CT Aufnahmen der Lunge einer BALB/c Maus zeigt die unterschiedlichen Lungenlappen. Die Lunge der Maus setzt sich aus insgesamt 5 Lungenlappen zusammen wobei die linke Lunge (Pulmo sinister) aus lediglich einem, nicht segmentierten Lungenlappen besteht (rot). Die rechte Lunge (Pulmo dexter) setzt sich aus dem Lobus cranialis (orange), Lobus medius (gelb), Lobus caudalis (grün) und dem Lobus accessorius (blau) zusammen, wobei letzterer auf die linke Lungenseite herüber ragt. (Thiesse *et al.*, 2010)

Der Grundlegende Aufbau der Lunge unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Spezies zumeist in der Anordnung und Anzahl der Lungenlappen. Anders als die humane Lunge setzt sich die Lunge von kleinen Nagern (Abb. 2-8) aus 5 Lungenlappen zusammen, die sich auf die rechte Lunge (Pulmo dexter) und die linke Lunge (Pulmo sinister) verteilen. Die linke Lungenseite ist dabei nicht gelappt und besteht aus lediglich einem Lungenlappen, wohingegen die rechte Seite aus dem vorderen Lappen (Lobus cranialis), dem mittleren Lappen (Lobus medius), dem hinteren Lappen (Lobus caudalis) und dem Hilfsappen (Lobus accessorius) besteht, wobei letzter auf die linke Lungenseite herüberraagt (Thiesse *et al.*, 2010).

2.3.1 Die Immunabwehr in der Lunge

In der Luft mitgeführte potentielle Pathogene die nicht bereits über die mechanischen Barrieren herausgefiltert wurden, stellen für einen gesunden Organismus kein größeres Risiko dar (Latge, 1999; Murphy, 2012). In den Alveolen angelangt treffen sie dabei zunächst auf die Alveolarmakrophagen (Abb. 2-7), eine gewebständige Immunzelle, die neben ihrer phagozytotischen Eigenschaften auch als Sensorzelle für Pathogene fungiert. Auch dendritische Zellen (nicht dargestellt)

lassen sich im Lungengewebe finden, sind aber im Gegensatz zu den Alveolarmakrophagen nicht direkt im Alveolarraum anzutreffen, sondern halten sich im Interstitium, dem Zwischenraum zwischen den einzelnen Alveolen, auf. Von dort greifen sie mit ihren dendritischen Zellausläufern in das Lumen der Alveolen, um dort potentielle Krankheitserreger zu detektieren und phagozytotisch aufzunehmen (Murphy, 2012).

2.3.1.1 Alveolarmakrophagen (AM)

Alveolarmakrophagen (AM) gehören, wie Makrophagen generell, zu den Phagozyten, also zu den Zellen die Pathogene aufnehmen und nach dem Internalisieren in kleinste Bausteine (z.B. Peptide) degradieren (Goldsby, 2006). Es handelt sich hierbei um gewebständige Makrophagen, die direkt in den Alveolen der Lunge persistieren. Voraussetzung für die Phagozytose ist die Erkennung des Pathogens, wofür verschiedene Rezeptoren auf der Oberfläche der Makrophagen verantwortlich sind (Murphy, 2012). Zu diesen Rezeptoren gehören die oberflächengebundenen Mustererkennungs-Rezeptoren (*Pattern Recognition Receptor* - PRR), die bestimmte Erkennungssequenzen oder –muster auf und in Pathogenen registrieren können (Murphy, 2012). Bei den erkannten Sequenzen handelt es sich um häufig auftretende und stark konservierte Strukturen von Pathogenen, die sogenannten PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) (Murphy, 2012).

Zu den PRRs gehören unter anderem die Mitte der 90er Jahre entdeckten *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) (Abb. 2-9) (Lemaitre *et al.*, 1996). Diese genetisch hochkonservierten Rezeptoren bestehen aus Leucin-reichen Sequenzen und einer TIR-Domäne (*Toll/IL-1R homology domain*) (Medzhitov *et al.*, 1997) und lassen sich unter anderem auf Makrophagen, sowie auch auf Neutrophilen Granulozyten, nachweisen (Murphy, 2012). Durch die Bildung von Hetero- oder Homodimeren (Abb. 2-9) können sie diverse pathogene Strukturen erkennen. Beispielsweise bindet der Toll-like Rezeptor 4 das von Bakterien produzierte Lipopolysaccharid (LPS), auch bekannt als Endotoxin (Poltorak *et al.*, 1998). Die Aktivierung der TLRs führt dabei intrazellulär zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung unterschiedlicher Kinasen und schließlich zur Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie

beispielsweise dem Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-12 (IL-12) (Murphy, 2012).

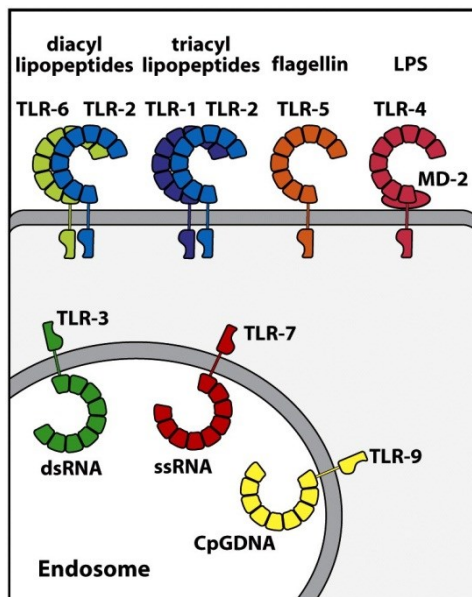


Figure 2-17 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Abbildung 2-9: zelluläre Lokalisation von TLRs

Toll-like Rezeptoren treten sowohl an der Zelloberfläche von Dendritischen Zellen, Makrophagen und Neutrophilen, als auch im Zellinneren an der Endosomenmembran auf, wo sie auf mikrobielle Komponenten wie DNA reagieren können. Die TLRs TLR-6 und TLR-2, sowie TLR-1 und TLR-2 agieren als Heterodimere (siehe Darstellung) wohingegen alle anderen dargestellten TLRs als Homodimere agieren. (Murphy, 2011)

Neben den bereits beschriebenen TLRs exprimieren Makrophagen eine Vielzahl an PRRs wie Glukanrezeptoren (Abbildung 2-10), Mannoserezeptoren oder *Scavengerrezeptoren*, die verschiedenste Lektine, Lipoproteine und Polysaccharide auf Pathogenen erkennen können (Arango Duque & Descoteaux, 2014). Nach Erkennung phagozytieren Makrophagen die Pathogene durch Ausbildung von Pseudopodien und internalisieren die aufgenommenen Partikel im Phagosom, welches durch einströmende Wasserstoffionen angesäuert wird. Anschließend verschmilzt das Phagosom mit dem Lysosom zum sogenannten Phagolysosom, wobei die im Lysosom befindlichen antimikrobiellen Enzyme zur Zersetzung des Pathogens führen (Goldsby, 2006). Einzelne Bruchstücke dieser Pathogene können auf dem Haupthistokompatibilitätskomplex II (*major histocompatibility complex class II* - MHC II) als Antigene präsentiert werden (Rink, 2012). Weiterhin enthalten die Lysosomen Superoxide, die über einen membranassoziierten NADPH-Oxidase-Komplex (Goldsby, 2006) gebildet werden und sowohl direkt antimikrobiell wirkend, als auch als Signalkaskadenmediatoren beschrieben sind.

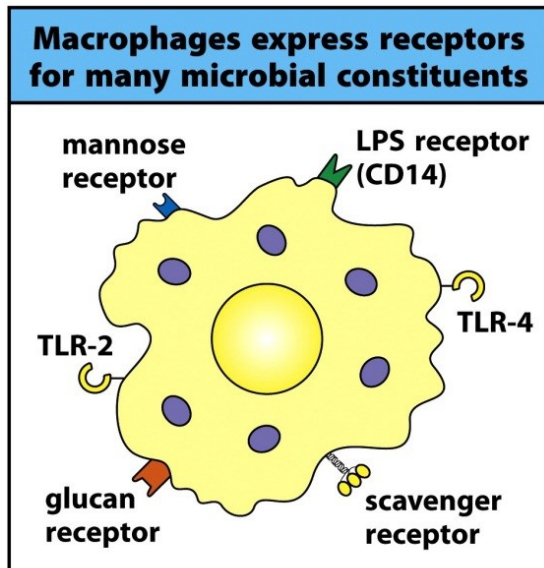


Figure 1-10 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Abbildung 2-10: Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen

Gewebsständige Makrophagen exprimieren verschiedene Rezeptoren mit denen sie Pathogene erkennen können. Dazu gehören unter anderem die sogenannten PRRs, wie die Toll-like Rezeptoren 2 und 4, aber auch Rezeptoren, die Pathogene anhand der sich in ihrer Membran befindlichen Komponenten erkennen. (Murphy, 2011)

Ausgelöst durch den Kontakt mit Pathogenen sind Makrophagen in der Lage über die Ausschüttung von chemotaktischen Botenstoffen andere Immunzellen wie Beispielsweise Neutrophile Granulozyten zu rekrutieren (Murphy, 2012).

2.3.1.2 Neutrophile Granulozyten

Bei den Neutrophilen Granulozyten handelt es sich um polymorphkernige Leukozyten (PMNs) die im Zuge der Hämatopoese im Knochenmark gebildet werden (Murphy, 2012). Ein wesentlicher Unterschied zu anderen Granulozyten, wie Eosinophilen und Basophilen, ist die Menge an Neutrophilen im Organismus. So findet man neben dem Reservoir im Knochenmark ca. 2-4 % der gesamten Neutrophilenpopulation zirkulierend im Blut. Bezogen auf die Gesamtheit an Leukozyten im Blut bedeutet dies, dass mit bis zu 70 % die Neutrophilen neben Lymphozyten und Monozyten, den größten Anteil an Leukozyten im Blut darstellen (Goldsby, 2006).

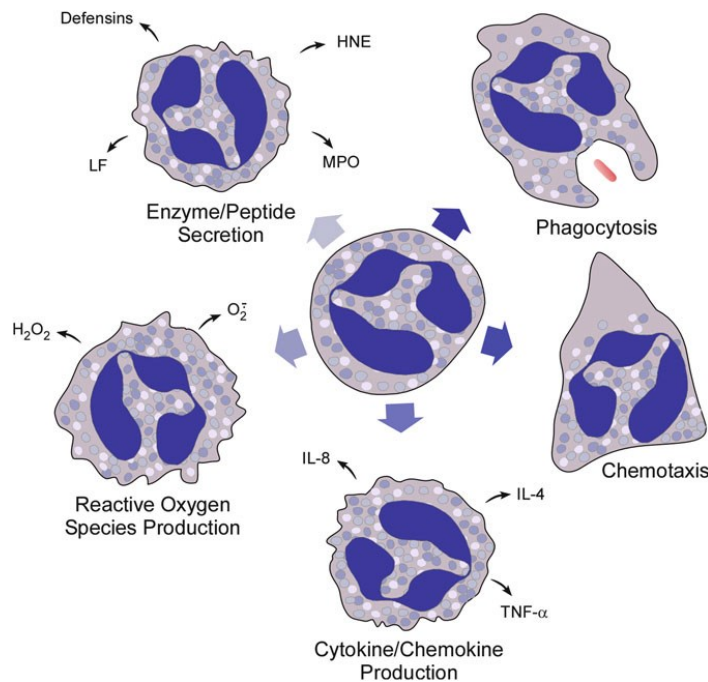


Abbildung 2-11: Mechanismen von Neutrophilen Granulozyten

Dargestellt sind die generellen Funktionen die durch Neutrophile ausgeübt werden können. Für die Bildung von ROS, Degranulation und Zytokinproduktion sind hier nur einige repräsentative Beispiele an sekretieren Molekülen gelistet. (Quinn, 2014)

Am Infektionsherd angekommen, stehen den Neutrophilen verschiedene Mechanismen zur Bekämpfung von Pathogenen zur Verfügung (Abb. 2-11). Im Zytoplasma der Granulozyten finden sich beispielsweise die namensgebenden Granula, Vesikel, die mit diversen antimikrobiellen Enzymen wie Myeloperoxidasen oder Elastasen angereichert sind. Nach Aktivierung sind die Neutrophilen in der Lage diese Vesikel freizusetzen (Degranulation) und so umliegende Pathogene enzymatisch anzugreifen (Abb. 2-11) (Gunzer, 2014; Quinn, 2014). Zusätzlich zur Degranulation können Neutrophile aber auch selbst Chemokine wie IL-8, IL-4 und TNF α freisetzen, um so weitere Immunzellen zu rekrutieren (Quinn, 2014). Neutrophile können Pathogene auch direkt phagozytieren, was die Erkennung des Pathogens entweder durch die oben beschriebenen PRRs oder durch die Opsonierung des Pathogens voraussetzt (Murphy, 2012). Für Neutrophile sind in den letzten Jahren beide Wege der Pathogenaufnahme beschrieben worden, wobei sie neben den bereits erwähnten TLRs auch andere PRRs wie C-Typ Lektinrezeptoren (CLRs) und *Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like* Rezeptoren (NLRs) exprimieren (Thomas & Schroder, 2013). Die Erkennung von opsonisierten Pathogenen erfolgt hauptsächlich über die Fc-Rezeptoren. Nach der Erkennung werden die Pathogene durch Endozytose aufgenommen und in Vesikel verpackt, die wiederum mit den Granula der Neutrophilen verschmelzen. Durch die enthaltenen Enzyme wie Kollagenasen, Peroxidasen und Lysozyme werden die enthaltenen Pathogene zersetzt (Goldsby, 2006).

Ein weiterer charakteristischer Mechanismus der Neutrophilen ist die sogenannte NETose (*neutrophil extracellular traps* - NET) (Bruns *et al.*, 2010). Dabei werden nukleäre DNA-Fäden regelrecht aus der Zelle herausgeschleudert und netzartig ausgeworfen. Zusätzlich binden diese DNA-Fäden die lytischen Enzyme der Granula und bilden eine hochtoxische, klebrige „Falle“ für Pathogene (Brinkmann & Zychlinsky, 2007). Durch die NETose und die Degranulation sind Neutrophile in der Lage nicht nur kleine Pathogene wie Bakterien zu degradieren, sondern auch größere Strukturen wie ausgekeimte Pilzhyphen anzugreifen (Bruns *et al.*, 2010).

Neben den Makrophagen und Neutrophilen sind auch die dendritischen Zellen in der Lunge an der Infektionsabwehr beteiligt. Auch sie können Pathogene phagozytieren und Bruchstücke von diesen auf ihrer Oberfläche exprimieren. Nach der Phagozytose wandern sie über das lymphatische System in den nächstgelegenen Lymphknoten ein und präsentieren diese Bruchstücke dort den T-Lymphozyten (Murphy, 2012).

Zusätzlich gibt es seit einigen Jahren auch für die Zellen des Lungenepithels Hinweise auf phagozytotische Aktivität (Chuquimia *et al.*, 2012), wobei deren Häufigkeit und immunologischer Kontext noch nicht vollständig verstanden ist .

2.3.1.3 Konsequenzen bei Aktivierung von Neutrophilen

Als eine der ersten Immunzellen der Infektabwehr haben Neutrophile Granulozyten eine besondere Bedeutung. Einerseits sind sie essentiell bei der Bekämpfung von Infektionen, andererseits können sie im aktivierten Zustand auch das Wirtsgewebe massiv schädigen. Dabei verringern diese Zellen beispielsweise im Falle einer Influenza Infektion nicht nur die Viruslast, ihr vermehrtes Auftreten nach Infektion erhöht auch die Mortalitätsrate nach einer Infektion (Brandes *et al.*, 2013). Vermindert man ihre Anzahl nach einer Infektion jedoch durch Depletion mit dem neutrophilenspezifischen Antikörper anti-Ly6G (Klon 1A8), so wird der tödliche Effekt gemindert (Brandes *et al.*, 2013). Auch bei weiteren Lungeninfektionen mit anderen Pathogenen wurde ein ähnlicher Effekt beobachtet (Grommes & Soehnlein, 2011; Soehnlein *et al.*, 2008), wobei sich die negativen Auswirkungen von infiltrierenden Neutrophilen nicht auf Lungeninfektion bzw. das Lungengewebe beschränken. Bereits in den frühen 90er Jahren wurde gezeigt, dass im Verlauf eines Schlaganfalls die durch Neutrophile freigesetzte Myeloperoxidase im Gehirn zu schweren Schäden

an den Neuronen und den damit einhergehenden neurologischen Ausfällen führt (Barone *et al.*, 1991). Aktuelle Studien in Mäusen konnten zeigen, dass die Neutrophilen bei künstlich induzierten Schlaganfällen über die Expression von VLA-4 (*very-late antigen 4*) an das Adhäsionsmolekül VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), welches auf den Endothelzellen exprimiert wird, binden und so in den Infarktbereich eindringen (Liesz *et al.*, 2011). Die Interaktion von Neutrophilen mit den Endothelzellen der Blutgefäße konnte durch die Blockade von VLA-4 reduziert werden (Neumann *et al.*, 2015), was zur Folge hatte, dass weniger Neutrophile in den Infarktbereich einwandern konnten und die Auswirkungen des Schlaganfall geringer ausfielen. Ein ähnliches Ergebnis konnte durch die Depletion der Neutrophilen über den depletierenden Antikörper anti-Ly6G erreicht werden (Neumann *et al.*, 2015).

Neben den Auswirkungen der Infektionsabwehr auf körpereigenes Gewebe wurde in den letzten Jahren auch der Einfluss von Neutrophilen bei Gefäßverschlüssen, diskutiert (Fuchs *et al.*, 2012; Martinod & Wagner, 2014). So konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass durch die Bildung von NETs die Koagulation von Blutplättchen und roten Blutkörperchen in Gefäßen gefördert wird. Die Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten kann demnach auch negative Konsequenzen für den Organismus nach sich ziehen. Dabei spielt die Regulierung dieser Zellen eine entscheidende Rolle. Ausgelöst durch inflammatorische Zytokine oder den Kontakt mit mikrobiellen Strukturen sezernieren Makrophagen und dendritische Zellen Interleukin-23 (IL-23) (Smith *et al.*, 2007). IL-23 wiederum regt in $\gamma\delta$ T-Zellen die Produktion von IL-17A an, was wiederum die Freisetzung von G-CSF und damit die Granulopoese anregt (Smith *et al.*, 2007). Treffen Makrophagen und DCs hingegen auf apoptotische Neutrophile, wird die Produktion von IL-23 herunterreguliert und somit die weitere Rekrutierung von Neutrophilen unterbunden (Smith *et al.*, 2007; Stark *et al.*, 2005).

2.4 *Aspergillus fumigatus*

Eine weit verbreitete Art der Lungeninfektionen ist die Infektion mit Sporen (Konidien) des Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus* (Latge, 1999). Dieser ubiquitär vorkommende Pilz produziert Konidien, die mit einer Größe von 2-3 μ m bis in die Alveolen der Lunge eindringen können (Latge, 2001). Bei immunkompetenten

Menschen kommt es bei Kontakt mit den Konidien nur selten zu ernsthaften Reaktionen, im Falle immunsupprimierter Personen hingegen kann eine Infektion bis zum Tod führen (Chabi *et al.*, 2015; Kwon-Chung & Sugui, 2013). Dabei ist die steigende Anzahl Immunsupprimierender Therapien, die z.B. nach Transplantationen angewendet werden um Abstoßungen zu verhindern, sowie die weite Verbreitung des Pilzes problematisch.

2.4.1 Vorkommen und Vermehrung

Als Saprobiont ist der Pilz in der Lage totes organisches Material zu zersetzen und die daraus gewonnen organischen Moleküle für den eigenen Stoffwechsel zu verwenden (Fleck & Brock, 2010; Rhodes, 2006). Beschrieben wurde er erstmals 1863 von dem deutschen Arzt und Botaniker Johann Baptist Georg Wolfgang Fresenius.

Neben den saprobiontischen Eigenschaften, die es ihm ermöglichen auf diversen Untergründen zu wachsen, ist dieser Schimmelpilz äußerst thermotolerant und kann selbst in Wüstenregionen überleben, wobei jedoch Temperaturen um die 37° C und eine humide Umgebung idealere Wachstumsbedingungen darstellen (Rhodes, 2006).

Seinen Namen verdankt *Aspergillus fumigatus* seiner Form und seiner Farbe. Die Struktur des Pilzes erinnert in der Vergrößerung (Abb. 2-12) an einen Aspergill, einen Weihwasserwedel, der bei christlichen Messen zum Versprühen von Weihwasser verwendet wurde. Der zweite Teil seines Namens leitet sich von der rauchgrünen Farbe (lat. *fumus* – der Rauch) des Pilzes ab, die sich vor allem in den Konidiophoren und den Konidien, den Sporen des Pilzes, zeigt (Jackson *et al.*, 2009; Youngchim, 2004). Die Vermehrung dieses Pilzes kann sowohl über einen sexuellen (Nierman *et al.*, 2005), als auch asexuellen Zyklus erfolgen, wobei der sexuelle Lebenszyklus im Labor nur unter extremen Bedingungen beobachtet werden konnte (O'Gorman *et al.*, 2009) und daher vermutlich eine untergeordnete Rolle spielt.

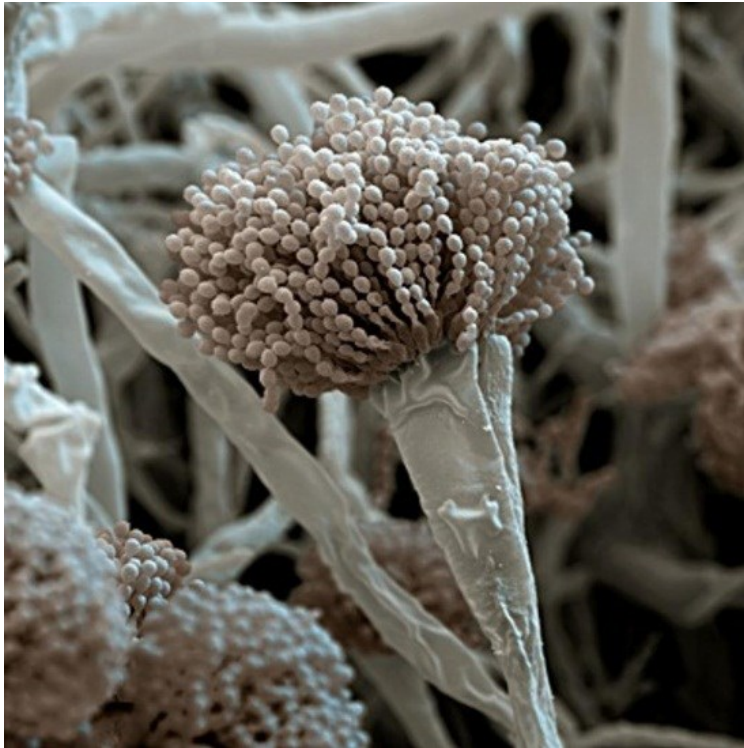


Abbildung 2-12:
Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Aspergillus fumigatus*

In der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme sind deutlich die kugelförmigen Konidien am oberen Ende der Konidiophoren zu sehen. (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Frank Gaillard) ¹⁰⁰⁴

Die häufigste Vermehrungsform ist die asexuelle, bei der die Konidien (Abb. 2-14) in großer Zahl gebildet und in die Umwelt entlassen werden (Latge, 2001). Landen diese Konidien auf günstigen Wachstumsbedingungen, fangen sie zunächst an zu schwellen. Dabei wird Wasser aus der Umgebung in die Spore aufgenommen und es kommt zu Veränderungen in der Zellwand wodurch sie auskeimt (Abb. 2-13; 2) und schließlich einen Keimschlauch (Abb. 2-13; 3-5) ausbildet.

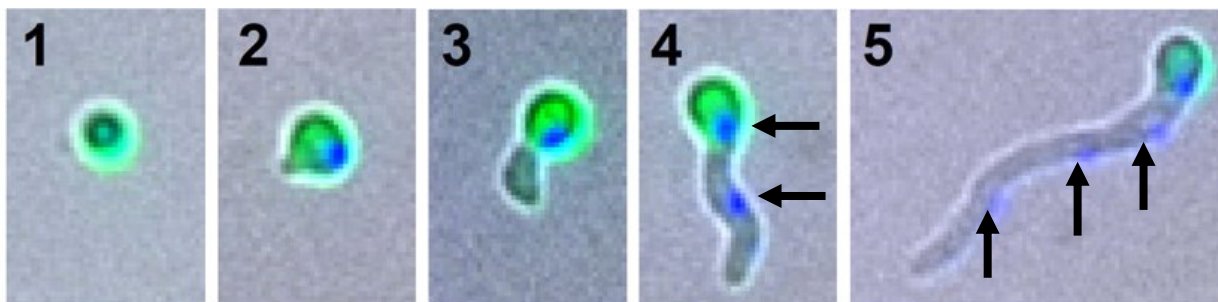


Abbildung 2-13: Keimstadien von *Aspergillus fumigatus*

Zu sehen sind die verschiedenen Keimstadien von *Aspergillus fumigatus* (grün) im Durchlichtmikroskop, wobei die Zellkerne in blau (DAPI) dargestellt sind. Abschnitt 1 zeigt eine ruhende Konidie, wobei der Zellkern kaum bis gar nicht sichtbar ist. In Abschnitt zwei bildet sich bereits der Ansatz des Keimschlauches, der Zellkern ist jetzt deutlich sichtbar. Abschnitt 3-5 zeigt das Wachstum des Keimschlauches, wobei ab Abschnitt 4 bereits mehrere Zellkerne (Pfeile) sichtbar sind. (modifiziert nach (Fleck & Brock, 2010))

Bei länger werdenden Keimschläuchen bilden sich sogenannte Septen, Scheidewände im Inneren des Schlauches, die der entstehenden Hyphe Stabilität verleihen, wobei jedes Hyphensegment einen eigenen Zellkern besitzt (Abb. 2-13; 4-

5). Zusätzlich können sich aus den Hyphen vertikal die sogenannten Konidiophoren abzweigen (Abb. 2-14). Am Ende jeder Konidiophore bilden sich die Phialiden, Vesikel mit einem Durchmesser von 20-30 μm aus denen sich kontinuierlich durch das Einziehen weiterer Septen die Konidien abschnüren (Abb. 2-12), welche nun wieder in die Umwelt entlassen werden. Damit schließt sich der asexuelle Zyklus und kann von neuem beginnen.

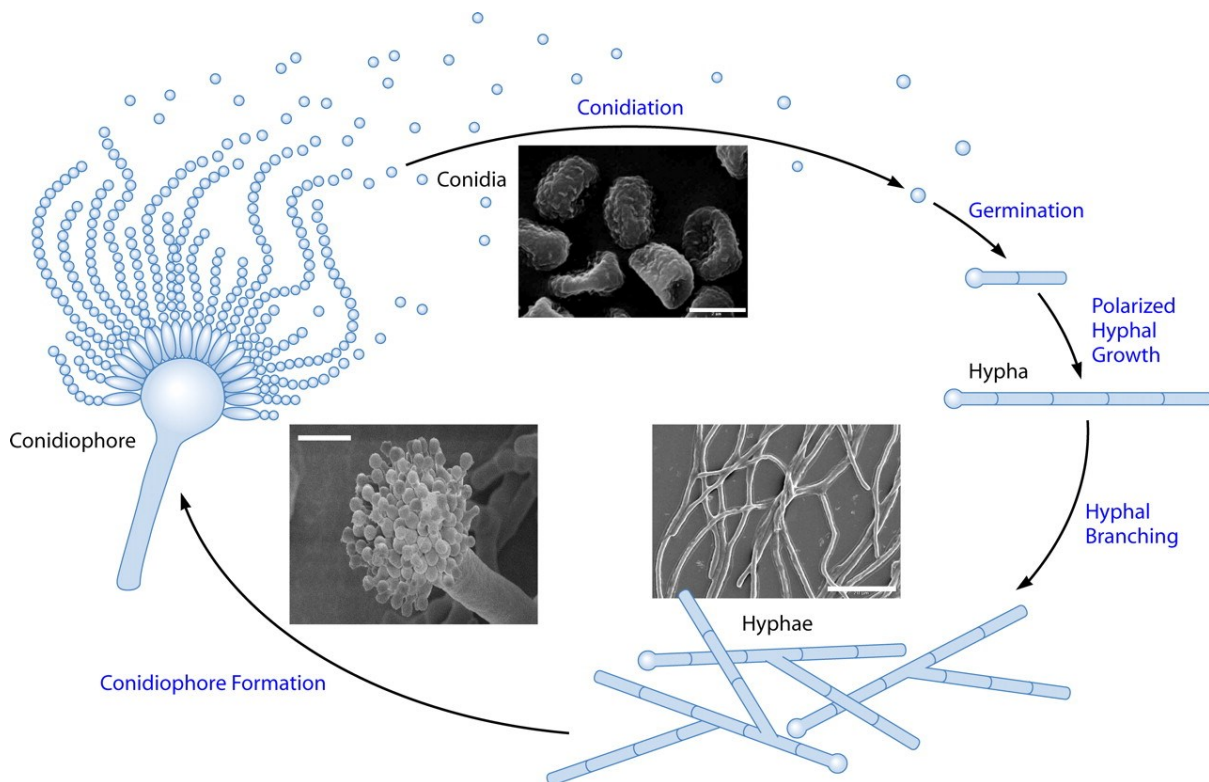


Abbildung 2-14: asexueller Lebenszyklus von *Aspergillus fumigatus*

Dargestellt ist der asexuelle Lebenszyklus von *Aspergillus fumigatus*, beginnend oben rechts mit den freigesetzten Konidien. Nach dem Auftreffen auf günstigen Nährboden schwellen den Konidien und bilden Keimschläuche aus, die durch das Einziehen von Scheidewänden (Septen) stabilisiert werden und bereits mehrere Zellkerne besitzen. Nachdem sich die Hyphen weiter verzweigt haben bilden sich die Konidiophoren aus, an deren Ende die Phialiden durch kontinuierliches Einziehen weiterer Septen neue Konidien abschnüren. (Shapiro *et al.*, 2011)

2.4.2 Pathogenität von *Aspergillus fumigatus*

Die Größe der Konidien (2-3 μm) und ihre hydrophobe Hülle sorgen dafür, dass sich diese über die Luft leicht verbreiten. Dabei kommt der Mensch täglich mit ihnen in Kontakt, vorrangig durch das Einatmen der Konidien. Weitere Eintrittspunkte können die Augen, Haut, die Bauchhöhle sowie der Gastrointestinaltrakt sein (Kami *et al.*, 2002).

Nach Eintritt der Konidien in den Organismus, zumeist über die Atemwege, reagiert dieser unterschiedlich den Pilz. Durch die Synthese von teilweise kanzerogenen Mykotoxinen (wie z.B. Gliotoxin) (Lewis *et al.*, 2005), ist die am häufigsten auftretende Komplikation nach Kontakt mit *Aspergillus fumigatus* eine allergische Reaktion wie allergisch bedingter Schnupfen oder das klassische Asthma. Durch die Verwendung von Antihistaminika und Kortikosteroiden sind diese Symptome allerdings gut behandelbar, wobei das Vermeiden von Expositionsherden aus naheliegenden Gründen ebenfalls empfohlen wird (Latge, 1999).

Neben allergischen Reaktionen auf die *Aspergillus* Konidien kann es jedoch auch zu weitaus schwerwiegenderen Komplikationen kommen. Dabei können die Konidien unter bestimmten Voraussetzungen nach Inhalation auskeimen und ein Pilzmyzel in der Lunge bilden. Ausschlaggebend hierfür ist die immunologische Konstitution des Menschen. Bei funktionierender Immunabwehr sind die eingeatmeten Konidien für den Organismus unschädlich, bei immunsupprimierten Menschen, sei es aufgrund einer Dysfunktion von Neutrophilen oder künstlich hervorgerufen z.B. bei Transplantatempfängern, kommt es jedoch immer häufiger zum Auskeimen der Konidien und führt zu unterschiedlichen Krankheitsbildern (Chabi *et al.*, 2015; Latge, 1999).

Grundlegend erfolgt die Einteilung betroffener Patienten dabei in 4 Kategorien, immer in Abhängigkeit ihres Immunstatus und eventueller Vorerkrankungen (Chabi *et al.*, 2015). Die vierte und schwerwiegendste Form ist dabei die invasive Aspergillose (IA), die zumeist bei immunsupprimierten Patienten auftritt. Durch die Unterdrückung des Immunsystems kommt es dabei zu einem ungehinderten Auskeimen des Pilzes, wobei die wachsenden Hyphen sowohl das bronchioalveoläre Gewebe als auch die angrenzenden Arteriolen zerstören (Chabi *et al.*, 2015). Dies führt zu Blutungen in der Lunge und begünstigt die systemische Ausbreitung des Pilzes. In Kombination mit der in Behandlung befindlichen Grunderkrankung führt die IA häufig zum Tod (bis zu 95 % letal) (Neofytos *et al.*, 2009).

In den letzten Jahren wurden hauptsächlich zwei Zelltypen, die Makrophagen und die Neutrophilen Granulozyten, des angeborenen Immunsystems identifiziert, bei deren Fehlfunktion oder vollständigem Fehlen die Anfälligkeit für eine invasive Aspergillose massiv ansteigt. Dabei konnte bereits vor einigen Jahren gezeigt werden, dass das

Fehlen von Neutrophilen in einem bestimmten Zeitfenster (3 h vor bis 24 h nach Konidienaufnahme) zu einer erhöhten Suszeptibilität im Mausmodell führt (Mircescu *et al.*, 2009). Diese Beobachtung korreliert mit klinischen Daten, die zeigen, dass vermehrt neutropenische Patienten, also Patienten mit einer geringeren Anzahl an Neutrophilen, von einer invasiven Pilzinfektion (*invasive fungal infection* - IFI) betroffen sind (Neofytos *et al.*, 2009).

2.4.3 Das Immunsystem der Lunge bei der Abwehr von *Aspergillus fumigatus*

Für die Erkennung von Pilzstrukturen (gekennzeichnet durch Glukane in der Zellwand) wurde der Rezeptor Dectin-1 als der Hauptrezeptor bei der Glukanerkennung durch Makrophagen beschrieben (Brown *et al.*, 2002), wobei er zusammen mit dem TLR2 über den MyD88 abhängigen Signalweg die Produktion von TNF α nach Aktivierung anregt (Brown *et al.*, 2003). Dabei dient MyD88 als Adapterprotein, bei dessen Aktivierung eine Signalkaskade ausgelöst wird, an deren Ende die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B steht (Brown *et al.*, 2003). Zusätzlich kann die Aktivierung des Dectin-1 Rezeptors auf Makrophagen, sowie auf Neutrophilen Granulozyten, die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (*respiratory burst*) auslösen (Dennehy & Brown, 2007).

Nach Kontakt mit den Sporen können Makrophagen neben TNF α auch weitere pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine wie IL-1, IL-6 und IL-8 auszuschütten, um so weitere Immunzellen zu rekrutieren. TNF α selbst induziert dabei die Lockerung des vaskulären Zellverbandes und ermöglicht es anderen Immunzellen wie Neutrophilen leichter aus dem Blutstrom in das betroffene Gewebe einzuwandern (Murphy, 2012). Zusammen mit IL-17 sorgt es des Weiteren für die Ausschüttung der Neutrophilen rekrutierenden Chemokine KC (*keratinocyte derived chemokine*) und MIP-2 (*macrophage inflammatory protein 2 alpha*) die, in Kombination mit den Chemokinen CXCL 3, CXCL 5 und CXCL 7 (Bacon, 2001), an den auf Neutrophilen exprimierten CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2 (IL-8RB) binden (Eash *et al.*, 2010).

Neben den Alveolarmakrophagen sind Neutrophile Granulozyten ein wichtiger Bestandteil bei der Bekämpfung einer Pilzinfektion. Im Falle einer pulmonalen Infektion können Neutrophile innerhalb weniger Stunden aus dem Knochenmark in die Lunge rekrutiert werden und dort die Sporen phagozytieren (Mircescu *et al.*,

2009). Sind die Sporen bereits geschwollen und damit zu groß um phagozytiert zu werden, sezernieren Neutrophile durch Exozytose die Inhalte ihrer Granula. Dabei werden unter anderem reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Defensine, also Proteine mit antimikrobieller Wirkung (Martin & Resch, 2009), freigesetzt, die sowohl geschwollene Konidien wie auch bereits ausgekeimte Hyphen angreifen. Um die Rolle verschiedener Zelltypen bei der IA zu untersuchen, ist es möglich diese Zellen durch die zuvor beschriebenen Methoden zu entfernen und anschließend eine Infektion auszulösen.

2.5 Funktion des Herzens

Während der experimentellen Infektionen nach Depletion durch DTX im CD11cDTR Modell kam es zu Auffälligkeiten der kardialen Funktionen, weswegen hier einige Grundlagen zum Aufbau und zur Reizweiterleitung beschrieben werden.

Grundlegend ist das Herz in vier verschiedene Bereiche aufgeteilt (Abb. 2-15), das rechte Atrium (RA), der rechte Ventrikel (RV), das linke Atrium (LA) und der linke Ventrikel (LV). Der rechte Vorhof (Atrium) ist dabei von der Rechten Herzkammer (Ventrikel) über die Trikuspidalklappe (TV), eine der Herzklappen, getrennt. Linksseitig trennt die beiden Kammern die Mitralklappe (BV) (Munshi, 2012; Silverthorn & Weber, 2009). Die Funktion des Herzens ist es Blut aus der Lunge durch den Blutkreislauf zu pumpen, um zum einen periphere Körperzellen mit Sauerstoff und diversen Nährstoffen zu versorgen, aber auch Stoffwechselabfallprodukte aus der Peripherie abzutransportieren. Dabei fließt das Blut zunächst aus dem Körperkreislauf durch die obere Hohlvene in den rechten Vorhof. Von dort wird es über die Kontraktion der Vorhöfe in die rechte Herzkammer gedrückt um dann über eine weitere Kontraktion, diesmal der Herzkammern, in den Lungenkreislauf zu gelangen. Angereichert mit Sauerstoff gelangt das Blut über den linken Vorhof zurück in die linke Herzkammer, um von dort aus durch den Körperkreislauf gepumpt zu werden (Silverthorn & Weber, 2009).

Die Pumpleistung der einzelnen Herzbereiche wird dabei unabhängig von Nervenzellen über eine komplexe Reizweiterleitung durch spezielle Muskelfasern synchronisiert. Hier unterscheidet man die normale Muskulatur, die für die Kontraktionen zuständig ist, von der spezialisierten Muskulatur, die für die Reizweiterleitung verantwortlich ist (Silverthorn & Weber, 2009). Ausgelöst wird das

Kontraktionssignal im Sinusknoten (Abb. 2-15) am rechten Vorhof, was zu einer Kontraktion desselben führt. Der elektrische Impuls der diese Kontraktion auslöst wird dabei vom Sinusknoten selbst erzeugt, man bezeichnet ihn daher auch als Schrittmacher. Vom Sinusknoten ausgehend verbreitet sich die Erregung bis in die Herzspitze. Dabei wird sie zunächst mit einer kurzen Verzögerung über den Atrioventrikular Knoten (AV Knoten, Abb. 2-15) an die His-Bündel weitergeleitet, die sich auf beiden Kammerseiten entlang des Septums befinden. Durch die Verzögerung im AV Knoten können sich die Vorhöfe zusammenziehen und das Blut in die Herzkammern drücken. Die Herzklappen dienen dabei als eine Art Rückschlagventil und verhindern das Rücklaufen von Blut in die Vorhöfe. Die Verteilung der Erregung setzt sich nun entlang der Purkinjefasern an der Herzspitze fort und ermöglicht so eine gleichmäßige Kontraktion beider Ventrikel. Dabei wird das Blut aus den Herzkammern in den Lungen- bzw. Körperkreislauf gepumpt. (Silverthorn & Weber, 2009)

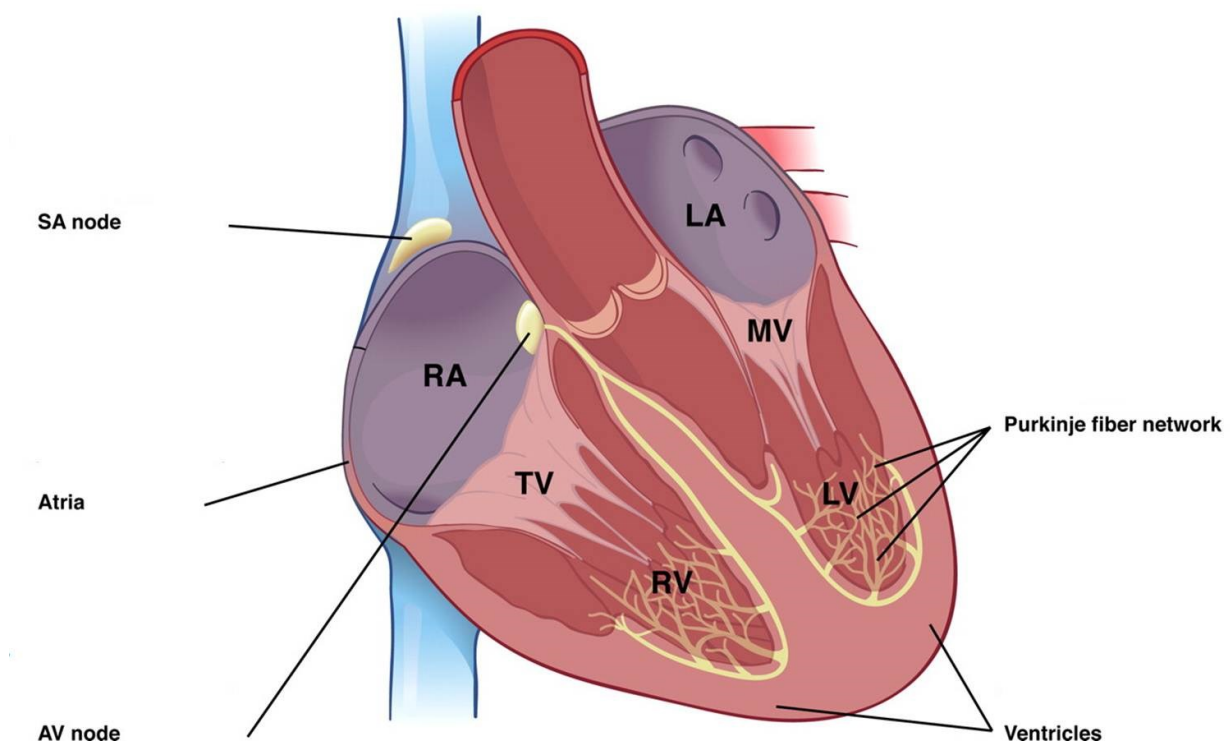


Abbildung 2-15: Aufbau und Reizweiterleitung des Herzens

Ausgehend vom Sinusknoten (*SA node*) beginnt die Ausbreitung der Reizweiterleitung über den rechten Vorhof (*RA*) zum AV Knoten (*AV node*). Von dort wird das Signal über die His-Bündel zur Herzspitze weitergeleitet, von wo aus die Purkinjefasern (gelbliches Geflecht) die Kontraktion der Ventrikel auslösen. (Munshi, 2012)

Diese Reizweiterleitung im Herzen lässt sich durch die Aufnahme eines Elektrokardiogrammes (EKG) messen, bei der die elektrische Potentialänderung,

ausgelöst durch die Erregungswellen, an der Körperoberfläche gemessen werden kann. Trägt man diese Messungen entlang einer Zeitachse auf, lassen sich die einzelnen Phasen der Erregungsweiterleitung, auch Wellen genannt, erkennen. Die Potentialänderungen werden dabei durch das Öffnen von Ionenkanälen in den Membranen der Muskelzellen ausgelöst, die das bisherige Membranpotential aufheben, man spricht hierbei von Depolarisation (Silverthorn & Weber, 2009). Ausgehend vom Start der Erregung im Sinusknoten depolarisieren zunächst die Vorhöfe, was als P-Welle im EKG (Abb. 2-16) zu erkennen ist. Die anschließende P-Q-Strecke gibt dabei die Erregungsweiterleitung durch den AV Knoten an die His-Bündel an, woraufhin es im QRS-Komplex zur Depolarisation der Ventrikel kommt. Nach der Kontraktion der Ventrikel zeigt sich in der T-Welle die Repolarisation der beiden Herzkammern woraufhin die nächste Erregungswelle ausgelöst werden kann (Silverthorn & Weber, 2009).

Elektrokardiogramm

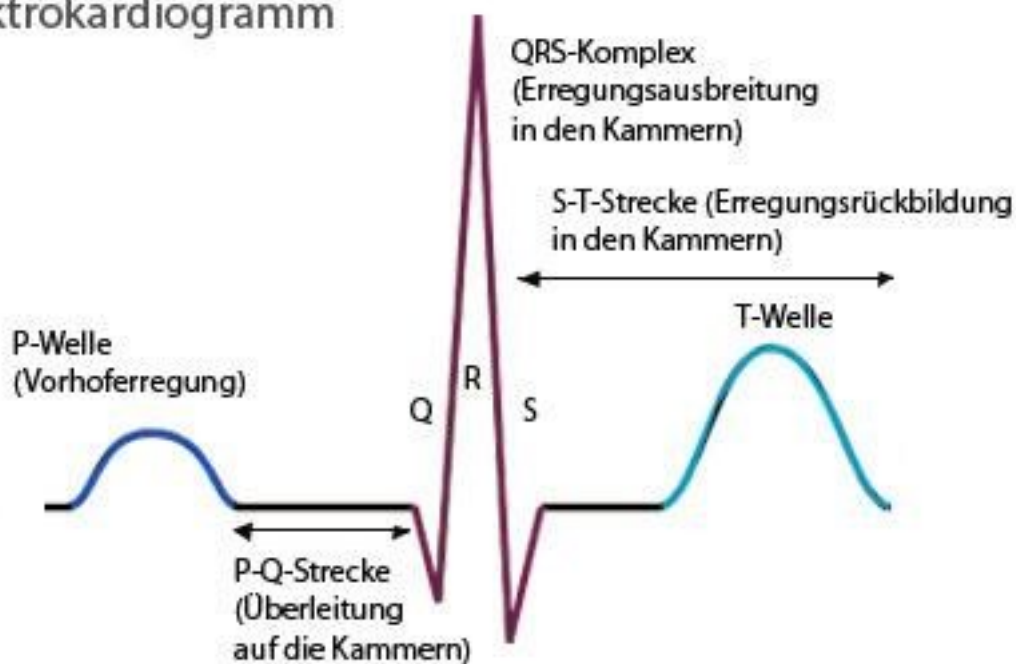


Abbildung 2-16: Elektrokardiogramm

Die einzelnen Abschnitte im Elektrokardiogramm beschreiben die unterschiedlichen Phasen der Erregungsweiterleitung im Herzen. Dabei beginnt die Erregung, ausgelöst am Sinusknoten, mit der Depolarisation der Vorhöfe (P-Welle). Die P-Q-Strecke zeigt hingegen die Erregungsleitung durch den AV-Knoten, bis sich die Erregung dann im QRS-Komplex in beiden Ventrikeln ausbreitet und diese sich zusammenziehen. Die T-Welle im Anschluss zeigt die Repolarisation der Ventrikel.¹⁰⁰⁵

Dabei ist zu beachten, dass sich das Muster der EKGs von Menschen und Mäusen unterscheidet (Abb. 2-17). Neben der deutlich höheren Frequenz von bis zu 720 Herzschlägen die Minute, verglichen zum menschlichen Herz, welches ca. 60-90 Mal

pro Minute schlägt, lassen sich vor allem Abweichungen im Verlauf der einzelnen Wellen finden (Kaese & Verheule, 2012). Beispielsweise gibt es nur eine kaum bis gar nicht sichtbare negative Auslenkung der Q-Welle und speziell der Übergang von S- auf T-Welle weicht deutlich ab. In der Maus gehen beide Wellen nahtlos ineinander über, d.h. die negative S-Welle steigt und geht ohne Unterbrechung in die positiv ansteigende T-Welle über. Der für ein menschliches EKG typische horizontale Verlauf der S-T-Strecke vor dem Anstieg der T-Welle fehlt hierbei vollständig.

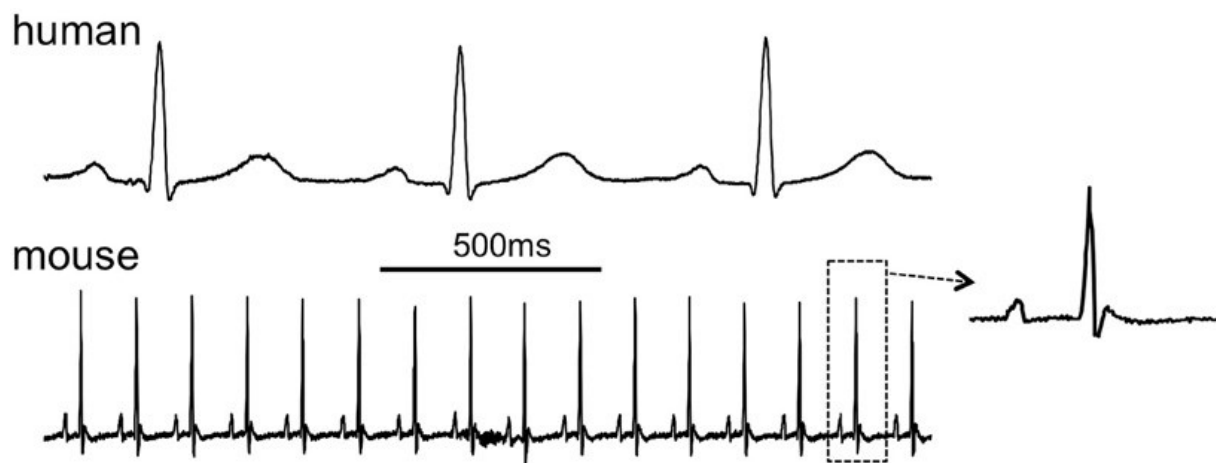


Abbildung 2-17: EKG von Mensch und Maus

Im Vergleich zum EKG beim Menschen kommt es bei der Maus zu Abweichung im QRS-Komplex. So lässt sich hier der negative Verlauf der Q-Welle nicht finden und auch der Übergang von S-Welle auf T-Welle erfolgt nahtlos ohne die für den Mensch typische zunächst gradlinig verlaufende S-T-Strecke. (Kaese & Verheule, 2012)

Störungen in der Reizweiterleitung können verschiedene Ursachen haben. Dazu zählen neben Erkrankungen der Herzkranzgefäße und damit einer Unterversorgung der Herzmuskelzellen, auch Funktionsstörungen in den Herzklappen, Herzinfarkte und Entzündungen des Herzmuskels (Myokarditis) (Epelman *et al.*, 2015). Aber auch Intoxikationen und Störungen der Ionenkanalfunktion können abnorme Reizweiterleitungen hervorrufen, da die Kontraktion der Herzmuskelzellen durch den Auf- und Abbau von Aktionspotentialen in der Zellmembran, und dem damit einhergehenden Ein- und Ausstrom von Natrium-, Kalzium- und Kaliumionen, einhergeht (Lupoglazoff *et al.*, 2001; Neu *et al.*, 2010; Smits *et al.*, 2005). Ein Beispiel für eine solche Störung ist das Brugada-Syndrom (Abb. 2-18) (Brugada *et al.*, 2014). Bei 35 % der Betroffenen wurden dabei Mutationen in Genen festgestellt, die Untereinheiten der Natrium-, Kalium- und Kalziumkanäle codieren und somit deren Funktion nicht vollständig gewährleisten. Derzeit wird das Syndrom für ca. 20 % der

spontan auftretenden Herztode (bei strukturell normalen Herzen) verantwortlich gemacht (Brugada *et al.*, 2014). Man unterscheidet beim Brugada-Syndrom in drei unterschiedliche Typen (1-3), die durch verschiedene Charakteristika im Verlauf des EKGs gekennzeichnet sind (Abb. 2-18). Die markanteste Ausprägung hierbei ist der negative Einbruch der T-Welle beim Typ 1 des Syndroms (Abb. 2-18, links).



Abbildung 2-18: Elektrokardiogramm des Brugada-Syndroms Typ 1-3

Abgebildet sind die verschiedenen Auffälligkeiten im Elektrokardiogramm bei Patienten mit Brugada-Syndrom. Bei der Typ 1 Erkrankung zeigt eine gewölbte ST-Erhebung von > 2 mm mit nachfolgendem negativen Einbruch der T-Welle. Auch beim Typ 2 und 3 kommt es zu einer sattelförmigen ST-Erhebung von 2 mm oder mehr. (Brugada *et al.*, 2005)

2.6 Zielstellung

Nachdem in den vergangenen Jahren bereits der Einfluss von Neutrophilen und Alveolarmakrophagen im Zusammenhang mit einer pulmonalen *Aspergillus* Infektion diskutiert wurde, konzentrierte sich ein Teil der Forschungsvorhaben in der Arbeitsgruppe Gunzer im Besonderen auf die Rolle der Alveolarmakrophagen nach Infektion mit dem Schimmelpilz. Bei Anwendung der beiden Depletionsmodelle, Clodronat-vermittelte AM Eliminierung und AM Depletion im transgenen CD11cDTR Mausmodell, kam es jedoch nach intratrachealer Infektion mit *Aspergillus fumigatus* zu vollständig divergierende Ergebnissen hinsichtlich der Überlebensraten. So hatte die Depletion im Clodronatmodell keinen Einfluss auf die Anfälligkeit und damit die Überlebensrate der Mäuse gegenüber der Infektion, ein Ergebnis, welches auch durch andere Gruppen bestätigt werden konnte (Mircescu *et al.*, 2009).

Die einmalige Depletion im CD11cDTR Modell hingegen erhöhte die Suszeptibilität der Mäuse gegenüber dem Schimmelpilz derart, dass alle Versuchstiere innerhalb

einer Woche nach der Infektion verstarben. Nachfolgend konnte gezeigt werden, dass die pulmonale Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten, die für die erfolgreiche Bekämpfung der Infektion als essentiell beschrieben wurden (Mircescu *et al.*, 2009), weder durch die Depletion mit DTX noch mit Clodronat inhibiert war. Auch durch die Ermittlung der pulmonalen Pilzlast über die Analyse koloniebildender Einheiten (CFU – *colony forming units*) nach einer Depletion mit anschließender Infektion konnten keine weiteren Unterschiede zwischen den Modellen gefunden werden. Es wurde gezeigt, dass die Pilzlast in den Depletionsmodellen sowie in den Kontrollgruppen nach einer Infektion mit *Aspergillus* kontinuierlich innerhalb weniger Tage auf ein kaum nachweisbares Level abnahm.

Somit blieb zu vermuten, dass die infizierten, DTX vorbehandelten, CD11cDTR Tiere nicht an einer mikrobiellen Infektion, sondern ggf. an einer unkontrollierten Immunantwort gegen diesen Auslöser verstarben. Die vorliegende Arbeit sollte diese These klären und die Rolle unterschiedlicher Immunzellen bei der erhöhten Mortalitätsrate im CD11cDTR Modell untersuchen.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Verbrauchsmaterial

Tabelle 3-1: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben

Material	Hersteller	Best.-Nr.
Adhäsions-Objektträger	Roth	PC66.1
Aluminiumprobenhalter (Ø 12,7 mm), Kopf gekerbt, Stift 3,1 mm	Science Services Laborbedarf	MT75210
Deckgläser (24 x 50 mm)	Thermo Scientific	190002450
Doppelseitiges-Karbon-Klebeband (50 mm)	Science Services Laborbedarf	P77817-50
Easydip™ Färbeküvetten	VWR	720-0791
Einbettkassetten (Histologie)	Carl Roth	K115.1
Einmal-Impfösen 10 µl	Carl Roth	EA90.1
Feindosierungsspritzen, 0,30x12 mm, 1 ml	Braun	REF 9161502
gentleMACS™ C Rührchen	Miltenyi Biotec	130-096-334
gentleMACS™ M Rührchen	Miltenyi Biotec	130-096-335
Glaskapillare, heparinisiert	Radiometer	NC0890183
Kanülen 0,6 x 25 mm, 23G x 1“	Becton Dickinson	REF 300800
Kanülen 0,8 x 50 mm, 21G x 2“	Becton Dickinson	REF 301155
Kunststoffröhrchen, konisch mit Schraubdeckel, 15 ml	Corning	REF 352096

Material	Hersteller	Best.-Nr.
Kunststoffröhrchen, konisch mit Schraubdeckel, 50 ml	Greiner bio-one	REF 227261
Microtainer SST™ Tubes	Becton Dickinson	REF 365951
Parafree Metall- Ausgießform 15 x 15 mm	Leica	39LC-700-2
Parafree Metall- Ausgießform 25 x 25 mm	Leica	39LC-700-3
Parafree Metall- Ausgießform 30 x 25 mm	Leica	39LC-700-4
Petrischalen 92x16 mm	Sarstedt	REF 82.1472
Pipetten, 10 ml	Greiner bio-one	REF 607180
Pipetten, 25 ml	Greiner bio-one	REF 760180
Pipetten, 5 ml	Greiner bio-one	REF 606180
Pipetten, 50 ml	Greiner bio-one	REF 768180
Röhrchen "Protein LoBind"; 1,5 ml	Eppendorf	022431081
Rotilabo® Reaktionsgefäß 5 ml, lichtundurchlässig	Carl Roth	PE 69.1
Röhrchen mit Sicherheitsverschluss; 1,5 ml	Eppendorf	0030 120.086
Röhrchen mit Sicherheitsverschluss; 2 ml	Eppendorf	0030 120.094
Rotilabo® Mikrotestplatten Deckel	Carl Roth	9297.1
Rotilabo® Mikrotestplatten Platten U-Profil	Carl Roth	9291.1
Spritzen 1 ml	Braun	REF 9161406V
Spritzen 10 ml	Becton Dickinson	REF 309110

Material	Hersteller	Best.-Nr.
Spritzen 2 ml	Becton Dickinson	REF 300928
Spritzen 20 ml	Terumo®	SS+T20ES1
Spritzen 5 ml	Becton Dickinson	REF 309050
Venenverweilkanüle 0,9 x 25 mm, 22G x 1“	Braun	REF 4254090B
Venenverweilkanüle 0.9 x 25 mm	Becton Dickinson	REF 381923
Venenverweilkanüle 1,1 x 32 mm, 20G x 1¼“	Braun	REF 4254112B
Zählkammer (Cellometer)	Peqlab	91-CMCCP-01
Zellkulturflasche 25 cm ²	Corning	430639
Zellkulturflasche 75 cm ²	Corning	430641
Zellkulturflasche 75 cm ²	Greiner bio-one	REF 658175
Zellsieb 100 µm	BD Falcon	REF 352360
Zellsieb 40 µm	BD Falcon	REF 352340
Zellsieb 70 µm	BD Falcon	REF 352350

3.1.2 Geräte

Tabelle 3-2: Verwendete Geräte mit Herstellerangaben

Gerät	Typ	Firma
Beatmungsgerät für Kleinsäuger	Mini Vent	Hugo Sachs
Bildgebungsstation	Imaging Station	VisualSonics
Blutgasanalysator	ABL800 Flex	Radiometer
CO ₂ -Inkubator	HERAcell 150i	Thermo Scientific
Durchflusszytometer	MACSQuant VYB	Miltenyi Biotec
Einbettstation	EG 1150 H/C	Leica
Farbkamera	DFC295	Leica
Gewebeeinbeter	STP 120	Microm
Hämatologiesystem	VetABC	scil
Homogenisator	GentleMACS	Miltenyi Biotec
Inkubator	MaxQ 6000	Thermo Scientific
Kamera	sCMOS	Andor™ Technology
Kritisch-Punkt-Trockner	CPD7501	Polaron / Quorum Technologies Ltd.
Lichtblattmikroskop	Ultramikroskop	LaVision Biotec
Mikrotom	HM 340 E	Microm
oszillierende Beatmung	flexiVent	Scireq
Photometer	Nanodrop	Peqlab
Probenrotator	MACSMix	Miltenyi Biotec
Rasterelektronenmikroskop	Hitachi-S4000	Hitachi High Technologies
Schwanenhalslampe	KL1500 LED	Schott
Sputter Coater	Cressington 108auto	Cressington Scientific Instruments Ltd.

Gerät	Typ	Firma
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
Ultraschall	Vevo2100	VisualSonics
Wasserbad	TW12	Julabo
Weitfeld Mikroskop	DMI6000	Leica
Werkbank	HERA safe	Thermo Scientific
Werkbank	Mars Safety Class 2	Scanlaf
Zellzähler	Cellometer™ T4	Peglab
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Zentrifuge	Multifuge 3SR+	Thermo Scientific

3.2 Chemikalien und Puffer

Tabelle 3-3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Best.-Nr.
2-Mercaptoethanol (50 mM)	gibco® by life technologies	REF 13150-010
Agar-Agar	Carl Roth	9002-18-0
Agarose GTQ	Carl Roth	6352.4
Chemokin CXCL1	PeproTech	250-11
Chemokin CXCL2	PeproTech	250-15
Clodronat Liposomen	Nico Van Rooijen	1002
CompBeads	BD Biosciences	552845
Dibenzylether	Sigma Aldrich	33630-1L
Diphtherietoxin 1 mg/ml	Sigma Aldrich	D0564
Diphtherietoxin 1 mg/ml	Merck Millipore	322326

Bezeichnung	Hersteller	Best.-Nr.
Eosin	AppliChem	A0822,0100
Ethanol (70 %)	Apotheke	150086
Ethanol (96 %; 1 % MEK)	Carl Roth	T171.3
Ethanol (99,8 %)	Carl Roth	9065.4
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA	A15-649
Hämatoxylin	Carl Roth	T865.3
Heparin (5000 U/ml)	Biochrom	L6510
Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer (HEPES)	Biochrom/Merck Millipore	L 1613
Isofluran (Forene® 100 % (V/V))	Abbott	B506
Isopropanol	Carl Roth	6752.4
Isotone Natriumchloridlösung (0,9 %)	Braun	PZN 1957160
Ketamin [50mg/ml]	Inresa	PZN 4089014
L-Glutamin	Biochrom/ Merck Millipore	K 0282
Liberase DH	Roche	REF 05 401 054 001
Natriumpyruvat	Biochrom/ Merck Millipore	L 0473
nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Biochrom/ Merck Millipore	K0293
PBS-Liposomen	Nico Van Rooijen	ClodronateLiposomes.org
Penicillin/Streptomycin	Biochrom/Merck Millipore	A2213
Pertex	Meditre	41-4012-00
Phosphatgepufferte-Saline-Lösung (PBS)	Biochrom	L 182-10

Bezeichnung	Hersteller	Best.-Nr.
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma Aldrich	P8139-1MG
Rompun [2 %] (Xylazin)	ceva	Apotheke
RPMI 1640 Medium	Biochrom	FG 1215
Trypanblau Lösung (0,4%)	Sigma Aldrich	T8154
Trypsin-EDTA	gibco® by life technologies™	25300
Wasser Ampuwa (für Injektionszwecke)	Fresenius Kabi	PZN 6178443
Xylol (98 %)	Carl Roth	9713.3

3.2.1 Puffer:Erythrozyten Lysepuffer
10 x stock20,73 g Ammoniumchlorid - NH_4Cl 2,5 g Kaliumbikarbonat - KHCO_3

0,093 g EDTA

mit deion. H_2O auf 250 ml auffüllenErythrozyten Lysepuffer
(1 x)15 ml Erythrozyten Lysepuffer
(10 x)mit deion. H_2O auf 150 ml auffüllenFixationspuffer ELMI

5 % Formaldehyd

2 % Glutaraldehyd

100 mM HEPES

10 mM MgCl_2 10 mM CaCl_2

90 mM Saccharose

d H_2O Ketamin/Rompun (Narkose):

1 ml Rompun [2 %]

4 ml Ketamin [50 mg/ml]

5 ml Natriumchloridlösung [0,9 %]

Komplettmedium (CM)

5 ml NEAA [100 x]
50 ml FCS
5 ml L-Glutamin [200 mM]
5 ml HEPES [1 M]
5 ml Natriumpyruvat [100 mM]
500 µl β-Mercaptoethanol [50 mM]
5 ml Penicillin / Streptomycin
(10000 U/ml)
500 ml RPMI Medium

MACS Puffer

1 L PBS
3,2 ml EDTA [0,5 M]
10 ml FCS

PBS/EDTA:

198 ml PBS
2 ml EDTA [0,5 M]

PBS/Heparin:

500 ml PBS
5000 U/ml Heparin

3.2.2 Mikrobiologische Nährmedien

Aspergillus Minimalmedium (AMM):

20 ml	wässrige Glukoselösung [50%]
20 ml	50x AMM Stock
2 ml	wässrige MgSO ₄ -Lösung [1 M]
1 ml	Hutners Spurenelementlösung

mit deion. H₂O auf 1000 ml auffüllen

für Festmedium 30 g Bacto-Agar zufügen

autoklavieren.

50x AMM Stock:

297,47 g NaNO_3

26,1 g KCl

74,85 g KH_2PO_4

mit deion. H_2O auf 1000 ml auffüllen

mit 10 M KOH auf pH 5,5 einstellen

autoklavieren

Hutners Spurenelementlösung:

- vereinen der Lösungen HSL 1 und HSL 3
- einstellen auf pH 6,5 (zunächst mit KOH Pellets, anschließend mit KOH Lsg.)
- auffüllen auf 200 ml mit deion. H₂O es sollte eine hellgrüne Lösung entstehen, die sich bei Lagerung lila verfärbt
- sterilfiltrieren und dabei aliquotieren in 50 ml Kunststoffröhrchen mit Schraubdeckel (4 x 45 ml, Rest verwerfen)
- Lagerung bei 4-8°C

HSL 11 g FeSO₄·7H₂O

10 g EDTA

nacheinander in 80 ml deion. H₂O lösen und den pH-Wert mit KOH Pellets auf 5,5 einstellen, wobei eine goldgelbe Lösung entsteht

HSL 20,22 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O

in 5 ml deion. H₂O lösen

HSL 32,75 g ZnSO₄·1H₂O2,2 g H₃BO₃1 g MnCl₂·4H₂O0,32 g CoCl₂·6H₂O0,32 g CuSO₄·5H₂O

5 ml HSL 2

nacheinander in 75 ml deion. H₂O lösen

3.2.3 Material - Molekularbiologische Methoden

Tabelle 3-4: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller	Bestell-Nr.
BD <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA) <i>mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit</i>	BD Biosciences	560485
CM-H2DCFDA (ROS Detektion)	Invitrogen	C6827
Lungen-Dissoziations-Kit	Miltenyi Biotec	130-095-927

3.2.4 Material - Immunologische Methoden

Tabelle 3-5: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie/*in vivo*

erkanntes Antigen	Kopplung	Klon	Hersteller	Best.- Nr.	Verdünnung
CD 11b	Horizon V450	M1/70	BD Biosciences	560455	1:250
CD11b	PE	M1/70	BD Biosciences	553311	1:500
CD11c	PE-Cy7	N418	BioLegend	117318	1:250
CD11c	PE	N418	eBioscience	12-0114	1:500
CD25	PE	PC61	BD Biosciences	553866	1:500
CD3ε	Brilliant Violet 421	145-2C11	BioLegend	100336	1:100
CD4	FITC	L3T4/GK 1.5	BD Biosciences	553729	1:100
CD45	FITC	30-F11	BD Biosciences	553079	1:100
CD45	PE-Cy7	30-F11	BD Biosciences	552848	1:500

erkanntes Antigen	Kopplung	Klon	Hersteller	Best.- Nr.	Verdünnung
CD45	AlexaFluor ® 647	30-F11	BioLegend	103124	15 µg
CD8	PE	Ly-2/53- 6.7	BD Biosciences	553033	1:500
CXCR3	Brilliant Violet 421	CXCR3- 173	BioLegend	126521	1:500
F4/80	FITC	BM8	eBioscience	11-4801	1:100
F4/80	APC	BM8	BioLegend	123116	1:500
F4/80	PE	BM8	BioLegend	123110	1:500
FOXP3	Horizon V450	MF23	BD Biosciences	561293	1:200
GFP	AlexaFluor ® 488	FM264G	BioLegend	338007	1:200
Gr-1	Horizon V450	RB6-8C5	BD Biosciences	560454	1:500
Gr-1	APC	RB6-8C5	BD Biosciences	553129	1:1000
Ly6G	Horizon V450	1A8	BD Biosciences	560603	1:1000
Ly6G	FITC	1A8	BD Biosciences	551460	1:100
MHCII	FITC	NIMR-4	eBioscience	ABIN33 5444	1:500
SiglecF	Brilliant Violet 421	E50-2440	BD Biosciences	562681	1:500

Tabelle 3-6: Verwendete Depletionsantikörper

erkanntes Antigen	Klon	Hersteller	Best.-Nr.	Konzentration
Gr-1	RB6-8C5	BioXcell	BE0075	100 µg/Maus
Ly6G	1A8	BioXcell	BE0075-1	200 µg/Maus
Isotyp Kontrolle Gr-1/Ly6G (LTF-2)	2A3	BioXcell	BE0090	200 µg/Maus
IL-5	TRFK-5	BioXcell	BE0198	200 µg/Maus
Isotyp Kontrolle IL-5	HRPN	BioXcell	BE0088	200 µg/Maus

3.3 *Aspergillus fumigatus* Stämme

Tabelle 3-7: Übersicht über verwendete Pilzstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
ATCC 46645	Wildtypstamm	(Hearn & Mackenzie, 1980)
D141	Wildtypstamm (klinisches Isolat)	(Staib <i>et al.</i> , 1980)

3.4 Versuchstiere

Für die Versuche wurden BALB/c (MacDowell *et al.*, 1927), C57BL/6 (Murray & Little, 1967) und CD11cDTR-Mäuse (Jung *et al.*, 2002) aus eigener Zucht bzw. aus dem Ankauf von Harlan-Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) bezogen. Die Mauslinien BALB/c (WT) und CD11cDTR wurden unter anderem für Infektionsversuche mit *Aspergillus fumigatus* verwendet, wobei es sich bei CD11cDTR Mäusen um eine transgene Linie handelt, deren CD11c positive Zellen den Rezeptor für Diphtherietoxin tragen und über Behandlung mit dem Toxin die rezeptortragenden Zellen depletiert werden können. Zusätzlich wurden als Kontrolltiere für die Detektion der Expression von grünem Fluoreszenzprotein (GFP) die Linien Histon EGFP (Hadjantonakis & Papaioannou, 2004) sowie CX3CR EGFP (Jung *et al.*, 2000) verwendet. Es wurden Tiere im Alter von 8-16 Wochen beiderlei Geschlechts verwendet, wobei Weibchen bevorzugt wurden.

3.5 Allgemeine Methoden

3.5.1 Kultivierung von *Aspergillus fumigatus*

Für die Neugewinnung von *Aspergillus fumigatus* Konidien wurden 100 µl der jeweiligen Konidien suspension in eine mit ca. 60 ml *Aspergillus* Minimalmedium befüllte Zellkulturflasche (75 cm² Grundfläche) ausplattiert und bei 37 °C für 4 Tage inkubiert. Innerhalb dieser 4 Tage konnte der Pilz auswachsen und neue Konidiophoren bilden. Um eine möglichst hohe Anzahl an Konidien in Suspension zu überführen, wurden in die Zellkulturflasche zunächst 10-15 sterile Glaskugeln (Ø 2 mm) und 10 ml autoklaviertes Leitungswasser hinzugegeben. Die Flasche wurde fest verschlossen und kräftiges Schütteln führte dazu, dass die Konidien abgeschwemmt wurden. Die so gewonnene Suspension wurde dann über ein 30 µm Zellsieb in ein 50 ml Röhrchen überführt, wodurch ungewollt abgeriebene Agarreste, sowie größere Myzelreste herausgefiltert wurden. Der Vorgang wurde mit weiteren 10 ml autoklaviertem Leitungswasser wiederholt und die Konzentration der Konidien suspension im Anschluss mittels Zellzähler bestimmt. Alle Arbeiten zur Pilzanzucht und –ernte erfolgten in einer entsprechenden separat belüfteten Werkbank.

3.5.2 Mausexperimente

3.5.2.1 Narkose

Im Zuge der Depletion, Infektion und Probengewinnung war es teilweise nötig die verwendeten Versuchstiere zu narkotisieren. Dabei fanden im Wesentlichen zwei unterschiedliche Narkosearten Anwendung, die im Folgenden mit **Kurzzeitnarkose**, bzw. **Allgemeinnarkose** benannt werden.

Als **Kurzzeitnarkose** erfolgte die Inhalation eines Isofluran-Sauerstoffgemisches, wobei der Anteil an Isofluran je nach Versuchstier 2-3 % betrug. Die Tiere wurden hierfür in eine entsprechend begaste Narkosekammer gesetzt, die gleichzeitig den Abzug von überschüssigem Isofluran in eine dafür ausgelegte Filterkartusche gewährleistete. Diese Art der Narkose diente lediglich kurzen Behandlungen unter einer Minute, bei denen das Tier kurzzeitig ruhig gestellt werden musste.

Bei länger andauernden Manipulationen wie der Intubation (siehe Methoden 3.5.2.2) fand die **Allgemeinnarkose** Anwendung. Hierbei wurde den Versuchstieren abhängig vom Körpergewicht [5 µl/g Maus] ein Gemisch aus Ketamin/Xylazin (siehe Methoden 3.2.1) intraperitoneal (i.p.) gespritzt, was zu einer Narkosedauer von i.d.R. 1-2 Stunden führte. Nach dem Beenden der Arbeiten am Tier wurden die Versuchstiere bis zum vollständigen Wiedererwachen in einem 15-Minutenrhythmus überwacht und das Wiederkehren der Reflexe überprüft.

3.5.2.2 Infektion mit *Aspergillus fumigatus*

Die Infektion mit *Aspergillus fumigatus* Konidien erfolgte jeweils am Tag 0, wobei die Versuchstiere je nach Experimentaufbau ggf. bereits an den Tagen -2 und -1 oder nur -1 vorbehandelt wurden (siehe Methoden 3.5.2.4-5). Für den Eingriff wurden die Tiere in eine Allgemeinnarkose versetzt und auf einer schräggestellten Arbeitsunterlage fixiert. Der Kehlkopfdeckel wurde bei entsprechender Beleuchtung über eine Schwanenhalslampe und der Verwendung eines Kleintier-Laryngoskops sichtbar gemacht. Die Intubation erfolgte dann über einen herkömmlichen Venenverweilkatheter (0.9 x 25 mm) bei dem die Kanüle gekürzt wurde, sodass sie komplett im Plastikschauch des Katheters verschwand. Dadurch blieb der Tubus steif und konnte in die Trachea eingeführt werden, ohne das Tier zu verletzen. Nach dem Setzen des Tubus wurde die innenliegende Kanüle wieder entfernt und die richtige Lage durch das Anschließen des Beatmungsgerätes für kleine Nager (MiniVent Hugo Sachs, March-Hugstetten, Deutschland) überprüft. Bei korrekter Lage des Tubus hob sich der Brustkorb in derselben Atemfrequenz wie am Gerät vorgegeben.

Über den Tubus wurden nach der Lagekontrolle jeweils 5×10^6 Konidien in 100 µl PBS appliziert und die Versuchstiere anschließend 1 Minute mit einem Volumen von 250 µl bei einer Frequenz von 250 Atemzügen pro Minute beatmet. Das gewählte Applikationsvolumen von 100 µl, sowie die weiterführende Beatmung sollten eine möglichst großflächige Verteilung der Konidien in der Lunge gewährleisten. Des Weiteren bewirkte die anschließende Beatmung eine bessere Verträglichkeit des Eingriffes am Tier, weswegen allein durch das intratracheale Applizieren keine Ausfälle in den Versuchsgruppen verzeichneten wurden und somit mit möglichst geringen Tierzahlen gearbeitet werden konnte.

3.5.2.3 Sterile Infektion

Als sterile Infektion wurde in dieser Arbeit die künstliche herbeigeführte pulmonale Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten verstanden. Dabei wurden die Mäuse wie oben beschrieben (Methodenteil 3.5.2.3) intratracheal (i.t.) intubiert und über den Tubus jeweils 500 ng der Chemokine KC und MIP-2 in PBS in einem Volumen von 50 µl in die Lunge appliziert. Im Anschluss wurden die Tiere jeweils 1 min beatmet.

3.5.2.4 Depletion mit Diphtherietoxin

Um die Alveolarmakrophagen der Lunge zu depletieren wurden CD11cDTR Tiere in Allgemeinnarkose versetzt wie unter 3.5.2.3 beschrieben intubiert. Über den gelegten Tubus wurden für die Depletion mit Diphtherietoxin (DTX), soweit nicht anders angegeben 100 µl DTX [1 µg/ml] appliziert und das Versuchstier im Anschluss 1 Minute mit einer Frequenz von 250 Atemzügen die Minute und einem Volumen von 250 µl pro Atemzug beatmet. Die Depletion mit DTX erfolgte jeweils 24 h vor der Infektion mit *Aspergillus fumigatus*.

3.5.2.5 Depletion mit Clodronat Liposomen

Wie bei der zuvor beschriebenen Depletion mit DTX wurden BALB/c Tiere in Allgemeinnarkose versetzt und wie unter 3.5.2.3 beschrieben intubiert. Die Applikation von 50 µl Clodronat Liposomen erfolgte ebenfalls i.t. über einen Tubus, wobei die Tiere im Anschluss 30 Sekunden beatmet wurden (250 Atemzüge/Minute; 250 µl/Atemzug). Die Behandlung mit Clodronat Liposomen erfolgte abweichend von der Depletion mit DTX an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag -2, Tag -1) mit je 50 µl Clodronat bzw. PBS Liposomen.

3.5.2.6 Neutrophilendepletion

Bei der Untersuchung des Einflusses von Neutrophilen Granulozyten im Zusammenhang mit Depletion und/oder Infektion wurde den Versuchstieren im Regelfall 24 Stunden vor der Infektion 200 µg des neutrophilendepletierenden Antikörpers Ly6G (Klon 1A8) in 100 µl Natriumchlorid i.p. injiziert. In einigen Versuchen variierte der Applikationszeitpunkt oder es wurde der weniger spezifische Antikörper Gr-1 (Klon RB6-8C5) verwendet, wobei je Tier 100 µg Antikörper in 100 µl PBS i.p. injiziert wurden. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper

auszuschließen wurde zur Kontrolle der Isotyp LTF-2 (Klon 2A3) in einer Konzentration von 200 µg/100 µl Natriumchlorid je Tier verwendet.

3.5.2.7 Überlebensrate

Da die Depletion der unterschiedlichen Zellarten direkten Einfluss auf die Suszeptibilität der Versuchstiere gegenüber einer Infektion mit *A. fumigatus* hatte, wurden die Tiere nach den entsprechenden experimentellen Behandlungen über mehrere Tage beobachtet. Dabei wurde der Gesundheitszustand anhand von Gewicht und allgemeinem Verhalten dokumentiert, wobei die im Tierversuchsantrag definierten Abbruchkriterien berücksichtigt wurden. Bei einem Gewichtsverlust größer als 20 % oder deutlichen Verhaltensauffälligkeiten wie Apathie, gekrümmter Haltung oder Isolation, wurden die Tiere schmerzfrei getötet und als „im Versuch verstorben“ vermerkt.

3.5.2.8 Blockierung der Rekrutierung von Eosinophilen Granulozyten

Um die Rekrutierung von Eosinophilen zu blockieren wurde der monoklonale Antikörper anti-Maus IL-5 (TRFK-5) i.p. appliziert. Für den Versuch wurden mit Clodronat behandelte BALB/c Mäuse 24 h nach der Depletion mit 5×10^6 Konidien des *Aspergillus fumigatus* i.t. infiziert. Die Applikation von 200 µg Antikörper in 100 µl PBS erfolgte 30 min vor Infektion. Die Analyse erfolgte entweder nach 24 h Inkubation mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der Eosinophilenanzahl in der bronchioalveolären Lavage (BAL) oder über die Ermittlung der Überlebensrate über einen Zeitraum von bis zu 6 Tagen.

3.5.2.9 Rekrutierung von Eosinophilen

Die Rekrutierung von Eosinophilen wurde durch die Applikation von Eotaxin-2 (CCL24), welches an den IL-5 Rezeptor auf Eosinophilen bindet und die chemotaktische Rekrutierung dieser Zellen unterstützt, ausgelöst. Dabei wurden DTX-behandelten CD11cDTR Tieren zum Zeitpunkt der Infektion 500 ng Eotaxin-2 in 50 µl PBS i.t. appliziert. Die Analyse erfolgte entweder nach 24 h Inkubation mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der Eosinophilenanzahl in der BAL, oder über die Ermittlung der Überlebensrate über einen Zeitraum von bis zu 6 Tagen.

3.5.2.10 *in vivo* Lungenfunktion

Für die Überprüfung der Lungenfunktion *in vivo* wurden CD11cDTR Mäuse mit 100 ng DTX oder PBS in jeweils 100 µl Volumen i.t. behandelt. Ebenso wurden BALB/c Mäuse mit 100 ng DTX oder PBS in einem Volumen von 100 µl i.t. behandelt. 96 h nach der Depletion wurden die Versuchstiere in Allgemeinnarkose versetzt und über einen Luftröhrenschnitt mit einer 20 G Kanüle intubiert. Die Mäuse wurden daraufhin künstlich mit dem flexiVent (SCIREQ, Montreal, Kanada) beatmet, wobei ein definiertes Volumen von 10 ml/kg und ein Druck von 2 cmH₂O (*positive end-expiration pressure* – PEEP) verwendet wurde. Die Luft wurde oszillierend (1,2s; 2,5 Hz) in das Versuchstier gedrückt wobei Druck, Fluss und Volumen beim Ausatmen des Tieres ermittelt wurden. Für die *in vivo* Funktion wurden Manöver mit einfacher Oszillation von 1,2 s und 2,5 Hz (SnapShot Perturbation) und niederfrequenter Oszillation von 3 s mit Frequenzen zwischen 1 und 20,5 Hz (Quick Prime Perturbation) verwendet. Neben den Basalwerten der Lungenfunktion wurde zusätzlich die Reaktion der Lunge auf die Reizung durch Acetylcholin (Ach) gemessen. Hierfür wurde nach Messung der Basalwerte Ach in den Konzentrationen 0,0 mg/kg, 0,1 mg/ml, 1 mg/ml, 3,16 mg/ml und 5,62 mg/ml in der Atemluft vernebelt und die o.g. Parameter beim Ausatmen des Tieres ermittelt. Nach Beendigung der Beatmungsmanöver wurde das Versuchstier noch in Narkose durch die Öffnung der *arteria carotis* ausgeblutet, wobei das Blut sowohl für die Analyse der Blutgaswerte, der Blutzellen, sowie von Zytokinleveln im Serum aufgenommen wurde.

3.5.2.11 Elektrokardiogramm

Die Aufzeichnung der Elektrokardiogramme (EKG) erfolgte am Ultraschallsystem Vevo2100 (VisualSonics, Toronto, Kanada) welches zusätzlich mit einer Bildgebungsstation (Imaging Station, VisualSonics) für kleine Nagetiere ausgestattet war, die neben der akkuraten Positionierung des Schallkopfes auch physiologische Parameter, wie EKG und Körpertemperatur, ermittelte. Hierfür wurden CD11cDTR Tiere sowie BALB/c Tiere mit PBS oder DTX vorbehandelt und nach 96 h unter Isofluranarkose an die Bildgebungsstation angeschlossen. Die Tiere wurden dabei mit den Pfoten an den Kontaktflächen der Bildgebungsstation (Abb. 3-1, gelber Pfeil) fixiert, wobei die Reizweiterleitung über ein Kontaktgel erfolgte. Die Aufzeichnung der EKGs erfolgte am PC, wobei jeweils 3 Sequenzen pro Tier im Abstand von mehreren Sekunden aufgenommen wurden.

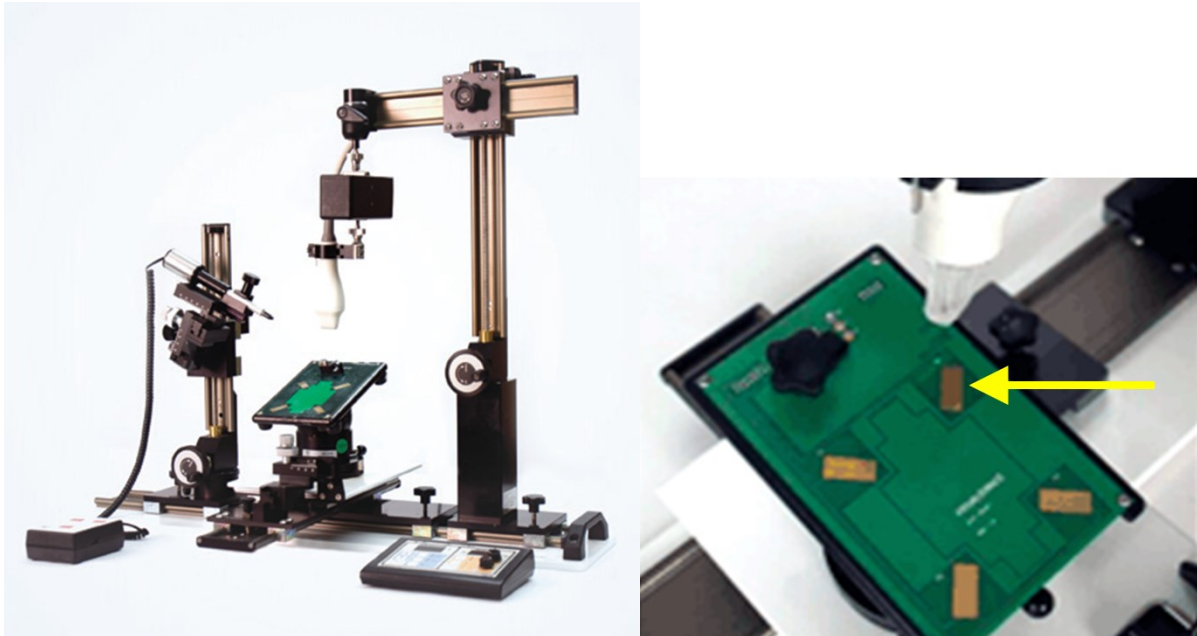


Abbildung 3-1: Vevo 2100 Imaging Station (VisualSonics)

Neben der genauen Positionierung des Schallkopfes ermöglicht die Bildgebungsstation über entsprechende Kontaktflächen (gelber Pfeil) die Aufnahme physiologischer Parameter wie EKG und Atemfrequenz.¹⁰⁰⁶

3.5.3 Probengewinnung

3.5.3.1 Bronchioalveoläre Lavage (BAL)

Zur Analyse der im Zuge der Depletion oder Infektion infiltrierenden Zellen oder der pro- und anti-inflammatorischen Zytokinlevel wurde die Lunge zu definierten Zeitpunkten nach Behandlung gespült. Dabei wurde, nach dem schmerzfreien Töten des Versuchstiers durch CO₂-Begasung, der Brustkorb eröffnet und die Lunge sowie die Trachea freigelegt. In die Trachea wurde eine Venenverweilkanüle (20 G, 1,1 x 32 mm) eingeführt, über die jeweils 1 ml PBS mittels einer 1 ml Spritze in die Lunge injiziert wurde. Nach ca. 2-3 Sekunden Inkubationszeit wurde die Flüssigkeit wieder herausgezogen, in ein entsprechend vorbereitetes 15 ml-Röhrchen überführt und auf Eis gelagert. In Abhängigkeit davon, welches Analyseverfahren im Anschluss durchgeführt werden sollte wurde dieser Vorgang mehrere Male wiederholt, wobei z.B. für eine anschließende FACS-Analyse zwischen 5-7 Mal gespült wurde um die Ausbeute an Zellen zu erhöhen. Die Zellsuspension wurde im Anschluss bei 350 x g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in PBS resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt. Für die Bestimmung der Zytokinlevel mittels *Cytometric Bead Array* (CBA) (siehe Methoden 3.5.4.2) wurde lediglich mit 1 ml PBS gespült und die Probe im Anschluss bei 500 x g für

10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20° C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.5.3.2 Herstellung einer Lungen-Einzelzellsuspension

Zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension aus dem gesamten Lungengewebe wurden die Versuchstiere durch zervikale Dislokation schmerzfrei getötet und der Brustkorb eröffnet, um Lunge und Trachea frei zu legen. Das Herz sowie der Thymus wurden entfernt und im Anschluss daran die Lunge entlang der Trachea herauspräpariert. Die einzelnen Lungenflügel wurden in PBS gespült und in ein vorbereitetes C-Röhrchen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) mit 2,4 ml Puffer S (siehe Kit Beschreibung, Lungen Dissoziations Kit, Miltenyi Biotec), 100 µl Enzym D und 15 µl Enzym A überführt. Nach verschließen des Röhrchens wurde das Gewebe im gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec) im Programm ‚m_lung_01‘ grob zerkleinert und anschließend im MACSMix Probenrotator (Miltenyi Biotec) bei 37° C 30 min rotierend inkubiert. Daran anschließend folgte die weitere Dissoziation im gentleMACS mittels des Programmes ‚m_lung_02‘.

Die Probe wurde nach der Dissoziation 1 min bei 350 x g zentrifugiert um das gesamte Probenmaterial im Röhrchen zu sammeln und anschließend über ein Zellsieb (70 µm) gefiltert, um nicht dissoziierte Gewebereste zu entfernen. Die so gewonnene Zellsuspension wurde erneut 5 min bei 350 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch das Auffüllen auf 20 ml mit PBS gestoppt und die Probe erneut bei 350 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nachfolgend in 5 ml MACS-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

3.5.3.3 Herstellung einer Herz-Einzelzellsuspension

Nach der zervikalen Dislokation wurde der Brustkorb des Versuchstieres eröffnet und sowohl Lunge als auch Herz freigelegt. Der gesamte Herzmuskel wurde herausgetrennt (ohne Thymus) und anschließend in einer Petrischale mit PBS weitestgehend vom Blut gesäubert, wobei der Muskel mittels OP-Schere in 2-4 Teile zertrennt wurde. Die einzelnen Muskelstücke wurden dann in ein C-Röhrchen mit 2 ml PBS/Liberase [0,1 mg/ml] im gentleMACS Dissociator im Programm

‚m_heart_01‘ vorzerkleinert. Die Probe wurde danach im MACSMix bei 37° C 60 min rotierend inkubiert und anschließend im Programm ‚m_heart_02‘ dissoziiert. Die so gewonnene Zellsuspension wurde über ein 100 µm Zellsieb gefiltert und bei 350 x g 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Reaktion durch das Auffüllen auf 20 ml mit PBS abgestoppt wurde. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 5 min bei 350 x g wurde das Zellpellet in 4 ml MACS-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

3.5.3.4 Probengewinnung nach Lungenfunktionstests

Im Anschluss an den *in vivo* Lungenfunktionstest wurden die Tiere schmerzfrei noch in Narkose durch das Durchtrennen der *arteria carotis* getötet. Bis zu 70 µl des austretenden Blutes wurden mittels einer heparinisierten Glaskapillare (CLINITUBES Kapillarröhrchen, Radiometer, Brønshøj, Dänemark) aufgenommen und umgehend die Blutgaswerte der Probe am Blutgasanalysator (ABL800 Flex, Radiometer) analysiert. Weitere 100 µl wurden auf die zelluläre Zusammensetzung mittels Bestimmung des kleinen Blutbildes am Hämatologiesystem (scil Vet ABC™, scil, Viernheim, Deutschland) überprüft. Das übrige Blut wurde in ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt und anschließen für 10 min bei 350 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand, in diesem Fall das Blutserum, für eventuelle weitere Analysen bei -80° C aufbewahrt.

Neben den Blutproben wurden diverse organische Proben gewonnen, wobei der Lungenkreislauf zunächst über das Einführen einer Kanüle in die rechte Herzkammer und die Applikation von bis zu 5 ml PBS gespült wurde. Anschließend wurde der Hilfsappen der Lunge (*Lobus accessorius*), ein verhältnismäßig kleiner, dreieckig geformter Lungenlappen der rechten Lungenseite, mittels einer Gefäßklemme abgebunden. Nach dem Abbinden wurde der komplette Lungenlappen entfernt und für die Bestimmung des Nass-Trocken-Gewichtes in ein vorher ausgewogenes 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt.

Der linke Lungenlappen (*Pulmo sinister*) wurde mittels einer Gefäßklemme am Bronchus vorübergehend abgeschnürt und die übrigen rechten Lungenlappen (*Lobus cranialis*, *Lobus medius*, *Lobus caudalis*) wurden mit 700 µl PBS über den Tubus einmalig gespült. Die BAL wurde in ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt und bei

350 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für eventuelle Analysen bei - 80° C aufbewahrt, das Zellpellet wiederum wurde in 80 µl Antikörperlösung resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Nach der BAL der rechten Lungenlappen wurden diese vorübergehend abgeklemmt und die Klemme am linken Lungenlappen wieder entfernt. In den linken Lungenlappen wurden bis zu 400 µl PFA [4 %] gespült, die Lunge am Bronchus mittels OP Garn abgeschnürt und der komplette, gefüllte Lungenlappen von den übrigen Lungenlappen abgetrennt. Die Probe wurde über Nacht in PFA gelagert und am nächsten Tag in 70 % Ethanol überführt und anschließend für die Einbettung in Paraffin vorbereitet.

Zusätzlich zu den Lungenproben wurden das Herz, die Nieren und ein Leberlappen inkl. Gallenblase ebenfalls über Nacht in PFA [4 %] fixiert und schließlich für die Einbettung in Paraffin in 70 % Ethanol überführt.

3.5.4 Analytische Verfahren

3.5.4.1 Detektion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Für die Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies wurde das Detektionskit CM-H₂DCFDA von Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) verwendet. Dabei diffundierte das CM-H₂DCFDA, ein Chlormethylderivat von H₂DCFDA, passiv in die Zellen, wo die Acetatgruppen der Verbindung durch intrazelluläre Esterasen gespalten wurden. Weiterhin reagierten die thiolreaktiven Chlormethylgruppen mit in der Zelle befindlichen Glutathionen und anderen Thiolen. Die darauffolgende Oxidierung führte zu einem fluoreszenten Produkt, welches in der Zelle verblieb.¹⁰⁰⁸

50 µg des lyophilisierten Puders wurden kurz vor der eigentlichen Verwendung in 86,5 µl DMSO gelöst und dann 1:1000 in PBS zur Gebrauchslösung (Endkonzentration 1 µM) weiterverdünnt. Zusätzlich wurde der Gebrauchslösung der Antikörper Ly6G (Klon 1A8) in der Farbe Horizon V450 (Verdünnung 1:1000) hinzugefügt, um bei der Analyse mittels Durchflusszytometer die Neutrophilen Granulozyten zu identifizieren.

Nach der wie oben (Methodenteil 3.5.2.3) beschriebenen sterilen Infektion wurden jeweils 1×10^6 Zellen der BAL (Methodenteil 3.5.3.1) in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß

überführt und mit Kompletmedium, bzw. Kompletmedium/PMA [500nM] 15 min bei 37° C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 350 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 350 x g für 5 min wurde das Zellpellet in 500 µl der Gebrauchslösung, bestehend aus dem Antikörper Ly6G und der ROS-Detektionslösung, resuspendiert und 20 min im Dunkeln (RT) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert (350 x g, 5 min), in 1 ml PBS resuspendiert, wiederum zentrifugiert (350 x g, 5 min) und das Pellet in 200 µl PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

3.5.4.2 Bead-basierte Multiplex Zytokin-Analyse

Um in einer Probe eine möglichst große Vielzahl an Zytokinen vermessen zu können, wurde das Zytokinanalyse Kit *cytometric bead array* Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA) verwendet, da mit diesem Kit die Zytokine IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNFα, IL-17A und IL-10 gleichzeitig vermessen werden konnten. Dabei banden die Proteine an sogenannte *Capture-Beads* die mit spezifischen Antikörpern gegen die entsprechenden Zytokine gekoppelt waren (Abb. 3-2, links). Nach der Bindung an die *Capture-Beads* band zusätzlich ein Phycoerythrin (PE) gekoppelter Antikörper (Detektionsantikörper) an die Zytokine, dessen Signal im Durchflusszytometer dann proportional zur Menge des Zytokins war (Abb. 3-2 rechts). Um die einzelnen *Capture-Beads* später unterscheiden zu können, waren diese je nach Spezifität unterschiedlich hell in der durchflusszytometrischen Analyse. Zusammen bildeten *Beads*, Antikörper und Proteine einen Sandwich-Komplex (Abb. 3-2, zweiter Abschnitt), wobei die einzelnen Zytokine anhand der Helligkeit der entsprechenden *Beads* identifiziert werden konnten, während die Helligkeit des Detektionsantikörpers die Menge an gebundenem Zytokin widerspiegelte.

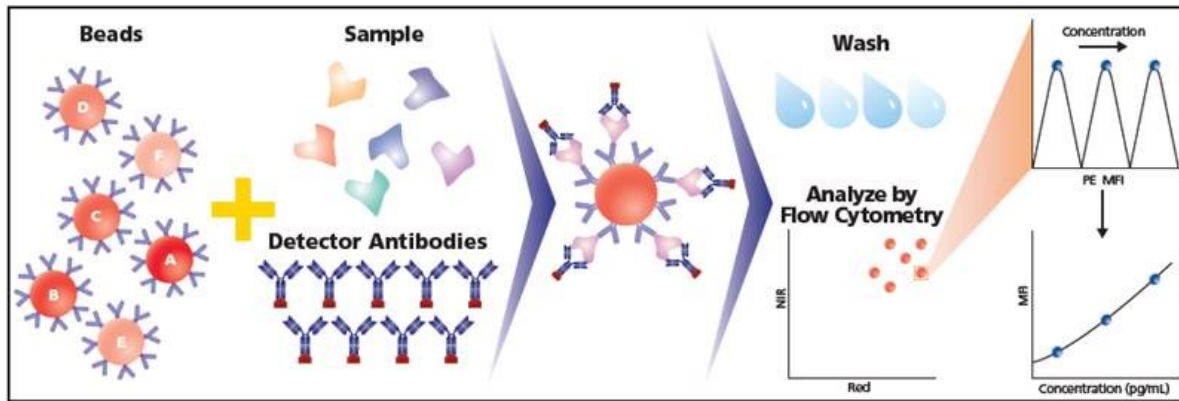


Abbildung 3-2: Cytometric Bead Array (CBA)

Für die Analyse von mehreren Zytokinen innerhalb einer Probe können die sogenannten *Capture Beads* (links) jeweils eines dieser Zytokine durch aufgelagerte Antikörper spezifisch binden. Unterscheiden lassen sich die verschiedenen *Beads* anhand ihrer Intensität (A-D) in einem definierten Kanal. An die gebundenen Zytokine können weiterhin die Detektionsantikörper binden (Mitte), deren Intensität im Fluoreszenzkanal später mit der Menge an gebundenem Zytokin korreliert.¹⁰⁰⁷

Für den Versuch wurden die Tiere entsprechend ihrer Gruppen vorbehandelt und mit 5×10^6 Konidien i.t. infiziert. Nach 8 Stunden Inkubationszeit wurden sie schmerzfrei durch CO₂ euthanasiert, die Lunge frei präpariert und in ein M-Röhrchen (Milenyi Biotec) mit 2 ml sterilem PBS überführt. Anschließend wurde die Probe im Programm „protein“ mit dem GentleMACS Dissociator dissoziiert und bei 350 x g für 5 min zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu sedimentieren. Der Überstand wurde in ein steriles 2 ml Reaktionsröhrchen überführt und bei -20° C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Für die Messung wurde zunächst die dem Kit beiliegende Standardprobe in 2 ml der ebenfalls mitgelieferten Verdünnungslösung (*assay diluent*) gelöst. Ausgehend von diesem sogenannten Topstandard (entsprach 5000 pg/ml) wurde eine Verdünnungsreihe (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 und 1:256) erstellt, wobei die Standards durch vorsichtiges pipettieren gemischt wurden. Die reine Verdünnungslösung diente dabei als 0 pg/ml Standard.

Für die *Capture Beads* wurde ein Mastermix, bestehend aus jeweils 10 µl der einzelnen *Capture Beads* (hier 7 verschiedene) pro Probe vorbereitet. Von diesem Mastermix wurden je 50 µl in eine bereits beschriftete 96-Loch-Mikrotestplatte mit U-Profil vorgelegt. Weiterhin wurden je 50 µl Standardprobe oder zu analysierende Probe in Doppelbestimmung hinzugegeben und zusammen mit weiteren 50 µl Detektionsantikörper in PE für zwei Stunden bei Raumtemperatur und unter Ausschluss von Licht inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte mit 100 µl

Waschpuffer aufgefüllt, bei 200 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Vorgang wurde mit 200 µl Waschpuffer wiederholt und die Proben anschließend in 200 µl Waschpuffer aufgenommen und am Durchflusszytometer vermessen.

3.5.4.3 Antikörperfärbung für die Analyse am Durchflusszytometer

Die Analyse von Zellpopulationen vor und nach der Depletion in verschiedenen Geweben erfolgte durchflusszytometrisch über die Bindung diverser Antikörper. Dabei wurden die Proben nach Überführen in eine Einzelzellsuspension mit 1 ml Erythrozytenlysepuffer für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch das Auffüllen der Probe auf 10-20 ml mit PBS gestoppt und die Suspension bei 350 x g für 5 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Zellen in einem adäquaten Volumen (bspw. BAL – 400 µl; Herzmuskel – 4 ml) MACS Puffer resuspendiert und je 200 µl auf eine 96-Loch-Rundbodenplatte aufgeteilt. Nach erneuter Zentrifugation bei 350 x g für 5 min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 80 µl Antikörperfärbelösung resuspendiert. Die Suspension wurde für 10 min bei RT unter Ausschluss von Licht inkubiert und anschließend bei 350 x g 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 200 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die Messung der Proben erfolgte am FACS Fortessa (BD Biosciences) bzw. MACS Quant VYB (Miltenyi Biotec) Durchflusszytometer und wurde mit der Software Summit bzw. MACS Quantify ausgewertet.

3.5.4.4 Aufbereitung histologischer Proben

Nach der Fixierung der Gewebe in 4 % PFA wurden diese einzeln in Einbettkassetten verpackt, gekennzeichnet und in 70 % Ethanol überführt. Anschließend erfolgte die automatisierte Trocknung (Gewebeeinbeter STP 120, Microm, Walldorf, Deutschland) der Proben in einer aufsteigenden alkoholischen Reihe und abschließender Einbettung in Paraffin (Tabelle 3-8)

Tabelle 3-8: Inkubationszeiten und Lösungen bei automatisierter Trocknung

Schritt	Lösung	Inkubationszeit
1	70 % EtOH	30 min
2	80 % EtOH	30 min
3	95 % EtOH	30 min
4	100 % EtOH – 1	1 h
5	100 % EtOH – 2	1 h
6	100 % EtOH - 3	1 h
7	Xylol – 1	30 min
8	Xylol – 2	30 min
9	Xylol – 3	30 min
10	Paraffin – 1	1 h
11	Paraffin – 2	1 h

Nach der Trocknung der Proben wurden diese mittels Ausgießformen in der Einbettstation (Leica, Wetzlar, Deutschland) in einen Paraffinblock eingegossen und bis zum Aushärten des Materials auf einer Kühlplatte gelagert. Anschließend wurden die Blöcke am Mikrotom (Microm) in 5 µm dicke Schnitte geschnitten und auf Adhäsionsobjektträger aufgezogen.

3.5.4.5 Entparaffinierung und H&E Färbung

Um die zuvor am Mikrotom generierten 5 µm Gewebeschnitte färben zu können, mussten zunächst die Rückstände des Paraffins entfernt werden. Dafür wurden die einzelnen Objektträger in eine Glashalterung gesetzt und zunächst für 10 min in einer Glasküvette mit Xylol inkubiert. Anschließend folgte ein weiterer Schritt in Xylol (10 min), sowie jeweils zwei Schritte in 96 % Ethanol (je 5 min) und 70 % Ethanol (je 3 min). Nach einer weiteren Minute in 50 % Ethanol wurden die Objektträger kurz in Leitungswasser getaucht und anschließend in destilliertem Wasser kurzfristig bis zur Färbung aufbewahrt.

Für die H&E Färbung wurden die Objektträger in die Halterung der EasyDip Färbeküvette eingespannt und bis zu 3 min (je nach Frische der Lösung) in Hämatoxylin getaucht. Anschließend wurden die Objektträger für dieselbe Zeit in Leitungswasser ausgewaschen. Das Ergebnis der Färbung wurde am Durchlichtmikroskop überprüft und die Färbung mit Hämatoxylin gegebenenfalls wiederholt. Daran anknüpfend erfolgte die Färbung mit 1 % Eosin, wobei die Objektträger lediglich für wenige Sekunden in die Färbelösung eingetaucht wurden.

Für die Färbung der Lungenschnitte wurden die Objektträger in der Regel 4 x eingetaucht, wohingegen die Färbung von kompakterem Gewebe lediglich durch 2 x Eintauchen erzielt wurde.

Anschließend erfolgte die Fixierung durch mehrmaliges Eintauchen der Objektträger in 70 % Ethanol, 90 % Ethanol, Isopropanol (2 x) und Xylol (2 x). Die Proben wurden nachfolgend mit Pertex und einem Deckgläschen versiegelt und bis zu Trocknung waagrecht gelagert.

Die Aufnahme der histologischen Präparate erfolgte am Weitfeld-Mikroskop DMI600 (Leica) mit den Trockenobjektiven 10 x (HI PLAN I 10x/0.22 PH1, Leica), 20 x (HCX PL FL L 20x/0.40 CORR PH1, Leica), 40 x (HCX PL FL L 40x/0.60 CORR PH2, Leica) und dem 100 x Ölobjektiv (HCX PL APO 100x/1.40-0.70, Leica). Verwendet wurde ebenfalls die am System verfügbare 3 MP Farbkamera (DFC295, Leica).

3.5.4.6 Klassifizierung der Myokardinfiltration

Die Analyse der histologischen Schnitte der Herzmuskel erfolgte 96 h nach der Depletion durch DTX in transgenen CD11cDTR Tieren sowie BALB/c Tieren (Proben nach den *in vivo* Lungenfunktionstests entnommen). Hierfür wurden die Herzen in PFA (4 %) über Nacht fixiert, wie oben beschrieben getrocknet und in Paraffin eingebettet. Die 5 µm dicken Schnitte wurden auf Adhäsionsobjektträger aufgezogen, mit H&E angefärbt und am Weitfeldmikroskop DMI6000 (Leica) mit den o.g. verfügbaren Objektiven aufgenommen. Die Einstufung des Schweregrades der Myokardinfiltration erfolgte anhand der Menge infiltrierter Zellen sowie des Vorhandenseins nekrotischer Bereiche (0 – keine Infiltration; 1 – einzeln auftretende Läsionen; 2 – multiple Läsionen; 3 – multiple Läsionen und nekrotische Bereiche; 4 – multiple Läsionen und nekrotische Bereiche im überwiegenden Teil des observierten Gewebes).

3.5.5 Probenaufbereitung für die Lichtblattmikroskopie

Bei der Lichtblattmikroskopie (*light sheet fluorescence microscopy* – LSFM) wird im Unterschied zur Konfokalen- oder 2-Photonenmikroskopie der sonst auf einen Punkt fokussierte Laserstrahl zu einem Lichtblatt ausgeweitet. Die Illumination der z-Ebene erfolgt dabei aus zwei entgegengesetzten Richtungen mit insgesamt sechs dieser Lichtblätter (Abb. 3-3). Das von der Probe emittierte Signal wird dann im rechten

Winkel zur Anregung/Probe detektiert, wobei die verschiedenen z-Ebenen anschließend dreidimensional am Computer rekonstruiert werden. Dieses Verfahren ermöglicht es, größere Proben wie vollständige Organe und Embryonen (Maus), bei zellulärer Auflösung als ein Objekt zu analysieren (Becker *et al.*, 2008; Ertürk *et al.*, 2012).

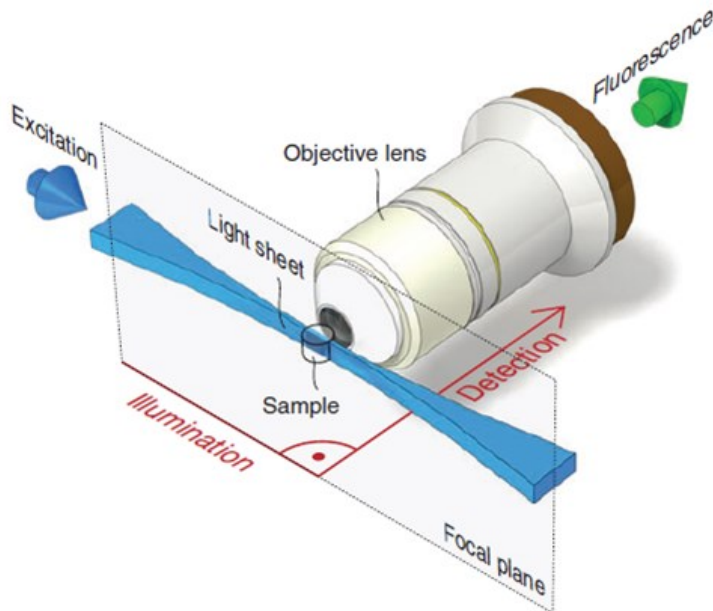


Abbildung 3-3: Funktionsprinzip Lichtblattmikroskopie

Bei der Lichtblattmikroskopie sind die Anregung (blauer Pfeil) und die Emission (grüner Pfeil) in zwei optische Pfade aufgeteilt, die orthogonal zueinander liegen. Die Illumination der Probe erfolgt dabei über mehrere Lichtblätter, welche die gesamte z-Ebene beleuchten. Die Aufnahme des emittierten Signals erfolgt über ein Objektiv, wie es auch bei der Weitfeldmikroskopie verwendet wird. (Huisken & Stainier, 2009)

Für die Analyse der Verteilung CD45 positiver Zellen im Herzmuskel wurden CD11cDTR Mäuse mit 100 ng DTX in 100 µl PBS i.t. vorbehandelt. Als Kontrollen wurden sowohl BALB/c Mäuse mit DTX sowie CD11cDTR Mäuse mit 100 µl PBS i.t. behandelt. Nach 96 h Inkubation wurde den Tieren unter Kurzzeithnarkose 15 µg anti-CD45 Antikörper, gekoppelt mit AlexaFluor® 647 (BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA), in einem Volumen von 50 µl PBS retrobulbär injiziert. Zwei Stunden nach der Applikation des Antikörpers wurden die Tiere schmerzfrei durch CO₂ getötet, der Brustkorb eröffnet und der Kreislauf perfundiert. Dafür wurde der linke Herzbeutel mit einem 21 G Katheter punktiert und 5 ml PBS/EDTA [5 mM] sowie anschließend 5 ml 4 % PFA durch den Kreislauf gespült. Der gesamte Herzmuskel wurde herauspräpariert und für 4 h bei 4° C in 4 %PFA fixiert und nachfolgend über Nacht in 50 % Ethanol inkubiert. Als nächstes folgte die Inkubation in 70 % Ethanol für 12 Stunden, sowie zwei weitere jeweils 12stündige

Inkubationsschritte in 100 % Ethanol. Die Proben wurden für sämtliche Inkubationsschritte in lichtundurchlässigen 5 ml Röhrchen rotierend bei 4° C gelagert. Nach der Dehydrierung wurden die Proben in Dibenzylether (DBE) überführt um die refraktären Indizes der Probe und des umgebenden Mediums aneinander anzupassen. Dies diente der Minimierung der Lichtstreuung innerhalb der Probe (*clearing* Prozess).

Die Analyse der Proben erfolgte bei 1,6 x Vergrößerung im Lichtblattmikroskop (Ultramikroskop, LaVision BioTec, Bielefeld, Deutschland) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm (optisch gepumpter Halbleiterlaser, 50mW) für die Autofluoreszenz und 647 nm (Diodenlaser, 50mW) für die spezifische Antikörperfärbung. Die Detektion der Signale erfolgte über eine sCMOS Kamera (Andor™ Technology, Belfast, Vereinigtes Königreich) mit den vorgeschalteten Bandpassfiltern 525/50 nm für das Signal der Autofluoreszenz und 680/30 nm für das bei 668 nm emittierte Signal der Antikörperfärbung.

Die Bearbeitung der Daten erfolgte computergestützt mit dem Programm IMARIS (Bitplane, Belfast, Vereinigtes Königreich).

3.5.6 Probenaufbereitung für die Rasterelektronenmikroskop (REM)

Für die hochauflösende Analyse von Lungengewebe wurde der Lungenkreislauf von CD11cDTR 48 h nach i.t. DTX Behandlung, sowie von unbehandelten BALB/c Mäusen durch Injektion von zunächst 5 ml PBS/EDTA in die linke Herzkammer gespült. Um das Abfließen des Blutes zu gewährleisten, wurde der rechte Vorhof durch einen kleinen Schnitt mit einer OP-Schere eröffnet. Nach der Perfusion mit PBS/EDTA wurde der Kreislauf mit 5 ml ELMI-Fixationspuffer gespült.

Anschließend wurde die komplette Lunge herauspräpariert, wobei sowohl Thymus als auch Herzmuskel entfernt wurden. Die Lunge wurde für 48 h Stunden bei 4° C in Fixationspuffer inkubiert und anschließend der linke Lungenflügel gleichmäßig in 4 Teile zerteilt. Die einzelnen Lungenstücke wurden auf eine 24-Lochplatte verteilt und die jeweiligen Vertiefungen mit ca. 1 ml 30 % Ethanol befüllt, bis die Lungenstücke komplett bedeckt waren. Nach 15 min Inkubation wurde der Alkohol durch 50 % Ethanol ersetzt. Dieser Schritt wurde mit aufsteigenden Konzentrationen an Ethanol (70 %, 80 %, 96 %, 2 x 100 %) alle 15 min wiederholt.

Nach der alkoholischen Trocknung wurden die Lungenstücke Kritisch-Punkt getrocknet. Dabei wurde der übrige Alkohol in der Probe durch das Einleiten von CO₂ in die Druckkammer des Kritisch-Punkt-Trockners (CPD7501, Polaron/Quorum Technologies Ltf., Lewes, Vereinigtes Königreich) verdrängt, welches unter dem gegebenen Druckverhältnis und einer Temperatur von weniger als -10° C flüssig vorlag. Nachdem die Kammer mit CO₂ geflutet wurde setzte sich der Alkohol am Boden der Kammer ab und konnte nach einer Wartezeit von 15 min langsam über einen Auslass, der sich ebenfalls am Boden befand, abgelassen werden. Der Vorgang wurde 4 Mal wiederholt, um den gesamten Alkohol aus der Probe zu verdrängen und durch flüssiges CO₂ zu ersetzen. Sobald die Lunge vollständig mit CO₂ durchsetzt war konnte die Temperatur in der Kammer und damit der Druck langsam erhöht werden. Der kritische Punkt trat auf sobald der höchstmögliche Druck und die höchstmögliche Temperatur erreicht wurden, an denen das CO₂ noch in flüssiger Form vorlag. Nach Erreichen des kritischen Punktes wurde der Druck langsam durch Ablassen des CO₂ verringert, die Temperatur wurde jedoch weiterhin kritisch gehalten, bis ein Normaldruck innerhalb der Kammer erreicht wurde. Durch diese Art der Trocknung bleiben die Strukturen von biologischen Präparaten erhalten, da die Einflüsse der Oberflächenspannung minimiert wurden.

Auf einem Aluminiumprobenhalter (Ø 12,7 mm) wurden die Lungenstücke mit doppelseitigem Karbonklebeband fixiert. Durch das Anbringen eines zweiten Probenhalters mit Karbonklebeband auf der gegenüberliegenden Seite konnte die Probe durch gleichzeitiges Auseinanderziehen beider Halter auseinandergebrochen werden. Dadurch wies die Probe neben den Schnittkanten der Präparation auch Bruchkanten auf. Anschließend wurden die Proben im *Sputter Coater* (Cressington Scientific Instruments Ltd., Hill, Vereinigtes Königreich) mit einer 7 nm dicken Argonschicht beschichtet, um die Leitfähigkeit im Elektronenmikroskop zu gewährleisten.

Die Aufnahmen der Proben erfolgten am Rasterelektronenmikroskop Hitachi S-4000 (Hitachi High Technologies, Chiyoda, Präfektur Tokyo, Japan).

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Neutrophilenantwort

Wie bereits in der Vergangenheit durch die Arbeitsgruppe von Prof. Gunzer gezeigt werden konnte, unterliegen CD11cDTR Tiere nach Depletion der Alveolarmakrophagen (AM) durch DTX (CD11cDTR Modell) und anschließender Infektion mit *Aspergillus fumigatus* einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber dieser Infektion (Abb. 4-1 Diplomarbeit Linda Männ; AG Gunzer, Magdeburg, 2010). Eine vergleichbare Depletion der Alveolarmakrophagen durch Clodronat Liposomen in BALB/c Mäusen (Clodronat Modell) zeigte jedoch verminderte Überlebensrate nach anschließender Infektion mit *A. fumigatus*.

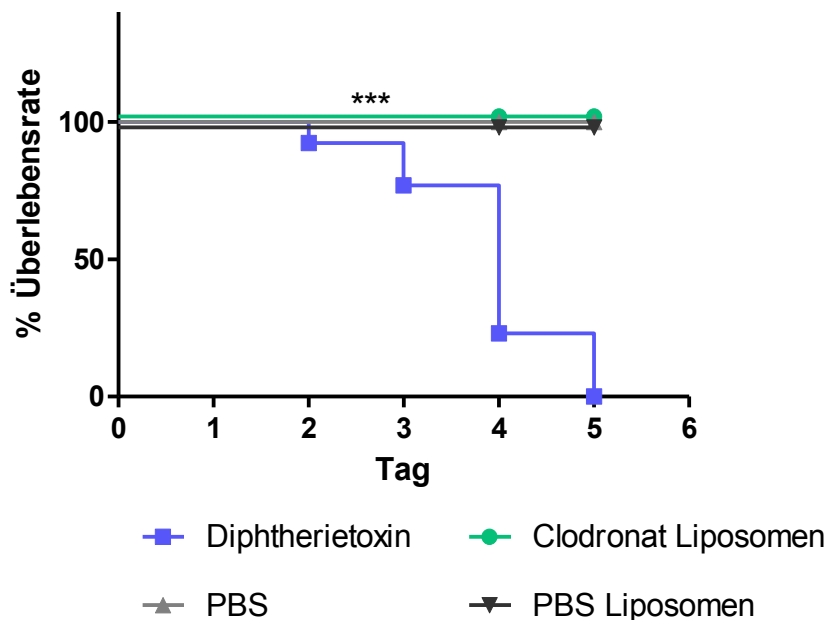


Abbildung 4-1: Überlebensrate nach AM-Depletion und Infektion mit *Aspergillus fumigatus*

Für die Analyse der Überlebensrate wurden CD11cDTR Tiere i.t. mit PBS oder DTX (100 ng/100 µl) vorbehandelt und am Tag 0 mit 5×10^6 Konidien i.t. infiziert. BALB/c Tiere wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit 50 µl PBS Liposomen oder Clodronat Liposomen i.t. behandelt und am Tag 0 mit 5×10^6 Konidien i.t. infiziert. Die Gruppen wurden über einen Zeitraum von bis zu 6 Tagen beobachtet. (n=3; $p \leq 0,0001$; Log-rank Mantel-Cox Test) (Abbildung aus der Diplomarbeit von Linda Männ, „Rolle der Alveolarmakrophagen bei einer pulmonalen Infektion mit *Aspergillus fumigatus*“)

Ferner konnte diese Beobachtung weder durch das Fehlen der essentiellen Neutrophilen Granulozyten (NØ) während der Infektion, noch durch ein vermehrtes

Auskeimen des Pilzes in der Lunge erklärt werden (Bachelorarbeit Jill Dalimot, AG Pro. Gunzer, Essen, 2013). Vielmehr folgten die Rekrutierung von NΦ, sowie der Abbau der Pilzlast in der Lunge derselben Kinetik wie im Clodronatmodell oder den entsprechenden immunkompetenten Kontrollgruppen. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Suszeptibilität war eine unkontrollierte Immunreaktion der NΦ, trotz gleicher Zellzahlen in den unterschiedlichen Depletionsmodellen. Von NΦ ist bekannt, dass sie durch Ausschüttung von Granulaproteinen wie z.B. Elastase und Myeloperoxidase umliegendes Gewebe, direkt und unspezifisch schädigen können (Kruger *et al.*, 2015; Mayadas *et al.*, 2014).

4.1.1 Sterile Inflammation - chemotaktische Rekrutierung

Um die reine Neutrophilenantwort studieren zu können, bedurfte es eines Systems der sterilen Zellrekrutierung, bei dem NΦ durch einen chemotaktischen Stimulus, ohne Einfluss des Pilzes, in die Lunge geleitet wurden. Die hauptverantwortlichen Chemokine für eine NΦ-Rekrutierung zum Ort der Infektion sind CXCL1 (KC) und CXCL2 (MIP-2). In einem Vorexperiment wurde ermittelt, dass eine i.t. Applikation von 500 ng KC, gemeinsam mit 500 ng MIP-2 zu einer massiven Rekrutierung von NΦ in die Lunge führte (Abb. 4-2).

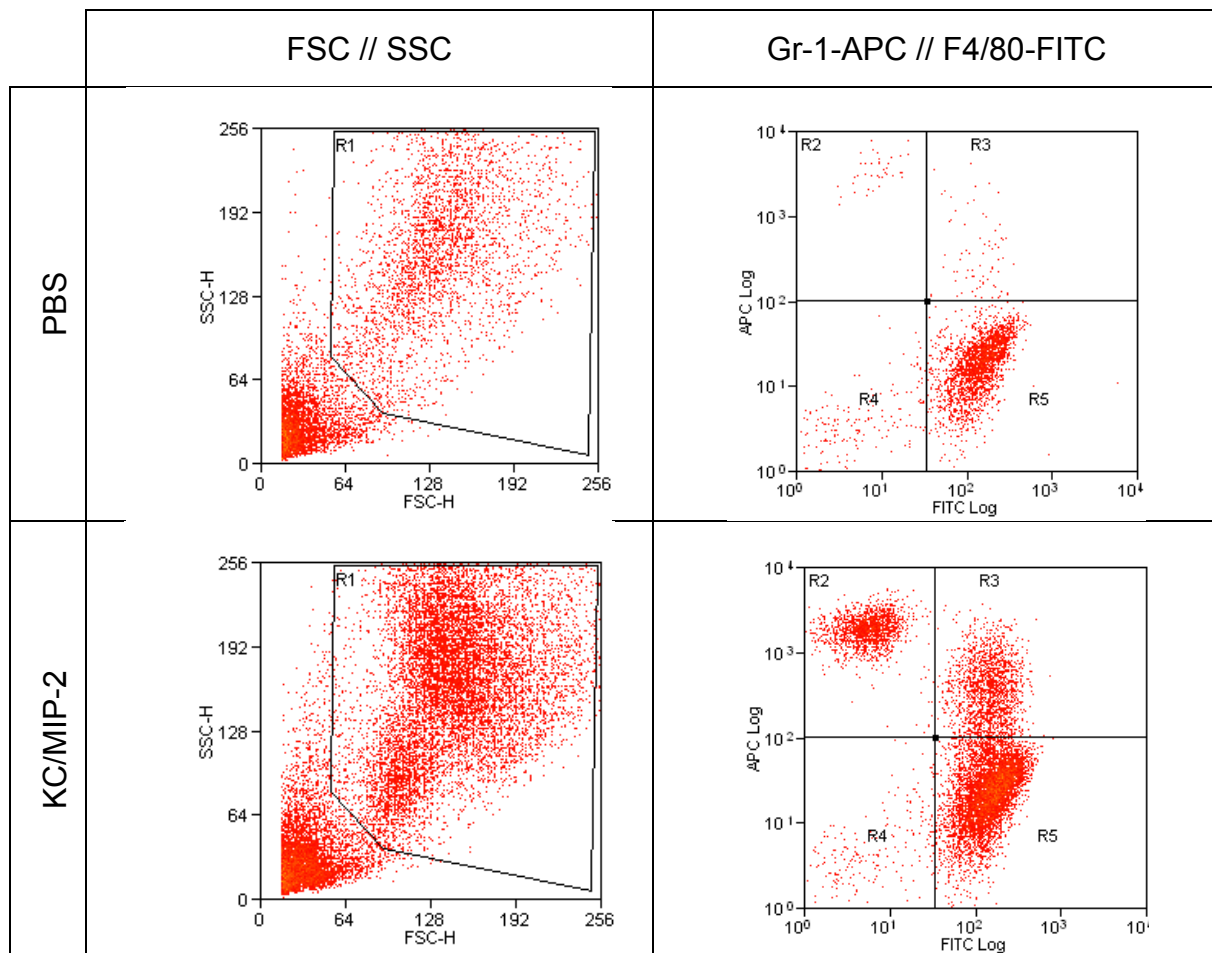


Abbildung 4-2: Rekrutierung von NΦ nach steriler i.t. KC/MIP-2 Behandlung

Nach der intratrachealen Applikation von PBS (oben), bzw. KC/MIP-2 [500 ng] (unten) wurde der Einstrom von NΦ in die Lunge durchflusszytometrisch bestimmt. Hierfür wurde 6 h nach Applikation die Lunge durch eine bronchioalveoläre Lavage gespült und die Zellen in der BAL mit den Antikörpern anti-Gr-1 (APC) und anti-F4/80 (FITC) angefärbt. Die Probe wurde zunächst auf die lebenden Zellen im FSC/SSC eingegrenzt (links, *Gate* R 1) und dann Signale der Antikörperfärbungen Gr-1 und F4/80 im Dotplot (rechts) gegeneinander aufgetragen. Die lediglich Gr-1 positiven NΦ sind im *Gate* R 2 erkennbar.

Davon ausgehend wurden im nächsten Ansatz BALB/c Mäuse entweder mit DTX/PBS oder Clodronat/PBS Liposomen, sowie CD11cDTR Tiere mit DTX/PBS behandelt. Allen Tieren wurde 24 h nach der Depletion statt der bisher verwendeten Pilzsporen KC/MIP-2 [500 ng] i.t. appliziert und die Tiere über einen Zeitraum von bis zu 6 Tagen beobachtet. Währenddessen wurde sowohl das Gewicht als auch der Allgemeinzustand der Tiere beurteilt.

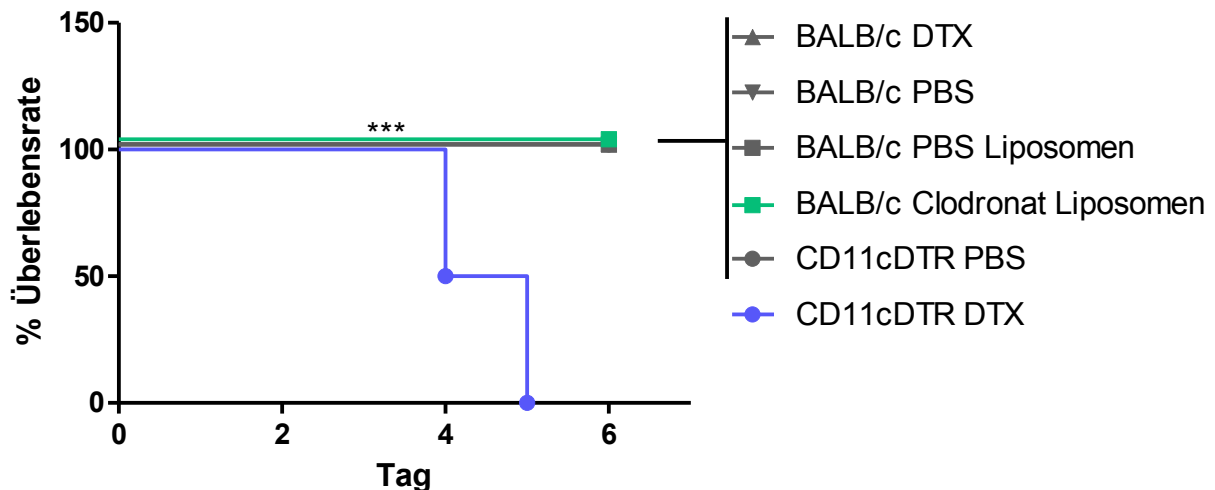


Abbildung 4-3: Überlebensrate nach Depletion und steriler Inflammation

Bei der sterilen Inflammation wurden BALB/c Tiere mit Clodronat Liposomen (Quadrat, grün), PBS Liposomen (Quadrat, grau), sowie DTX (Dreieck, grau) und PBS (Dreieck, grau) i.t. vorbehandelt. Parallel dazu erfolgte die i.t. Depletion durch DTX (Kreis, blau) und PBS (Kreis, grau) an CD11cDTR Mäusen. Alle Tiere wurden am Tag 0 mit KC/MIP-2 [500 ng] i.t. behandelt, um die Rekrutierung von NΦ in die Lunge auszulösen. Die Versuchsgruppen wurden über einen Zeitraum von bis zu 6 Tagen beobachtet. (n=3; p≤0,0001; Log-rank Mantel-Cox Test)

Auch hier konnte der gleiche Effekt wie nach der Pilzinfektion beobachtet werden. CD11cDTR Tiere, die mit DTX behandelt wurden, verstarben zu 100 % (Abb. 4-3), wohingegen alle anderen Gruppen keine letale Reaktion auf die Behandlung zeigten. Allein die Rekrutierung von NΦ in das bereits vorbehandelte Gewebe verursachte demnach die erhöhte Mortalität in CD11cDTR Tieren nach DTX Behandlung.

4.1.2 Reaktive Sauerstoffspezies nach Depletion

Nachdem gezeigt wurde, dass die erhöhte Mortalität möglicherweise von einer Reaktion der NΦ ausging, sollte der Grund für das Versterben identifiziert werden. Ein wichtiger Parameter zur Messung der Reaktivität von NΦ war die Quantifizierung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche im Zuge einer Aktivierung der NΦ in großen Mengen produziert werden (oxidativer *Burst*). Daher wurden im nächsten Versuch NΦ durch die Gabe von KC/MIP-2 in die Lunge rekrutiert und über den Farbstoff CM-H2DCFDA die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies durchflusszytometrisch bestimmt. Hierfür wurden BALB/c Tiere entweder mit Clodronat Liposomen oder DTX behandelt, sowie AM in CD11cDTR Tieren mittels DTX depletiert. Als Kontrollen diente hierbei die Vorbehandlungen mit PBS oder PBS Liposomen. 24 h nach der Vorbehandlung wurde den Tieren KC/MIP-2 [500 ng] i.t.

appliziert und nach 6 Stunden Inkubation die Lunge mit 5 x 1 ml PBS gespült. Die gewonnene Probe wurde geteilt und eine Hälfte zusätzlich mit PMA für 15 min stimuliert. Dies sollte zeigen, ob sich die NΦ durch ein potentes Signal wie PMA zusätzlich stimulieren ließen oder ob die Rekrutierung allein bereits eine erhöhte Aktivität der NΦ auslöste. Nach der zusätzlichen Stimulation erfolgte das Anfärben der ROS laut Protokoll, sowie die gleichzeitige Markierung der Probe mit dem anti-Gr-1 Antikörper.

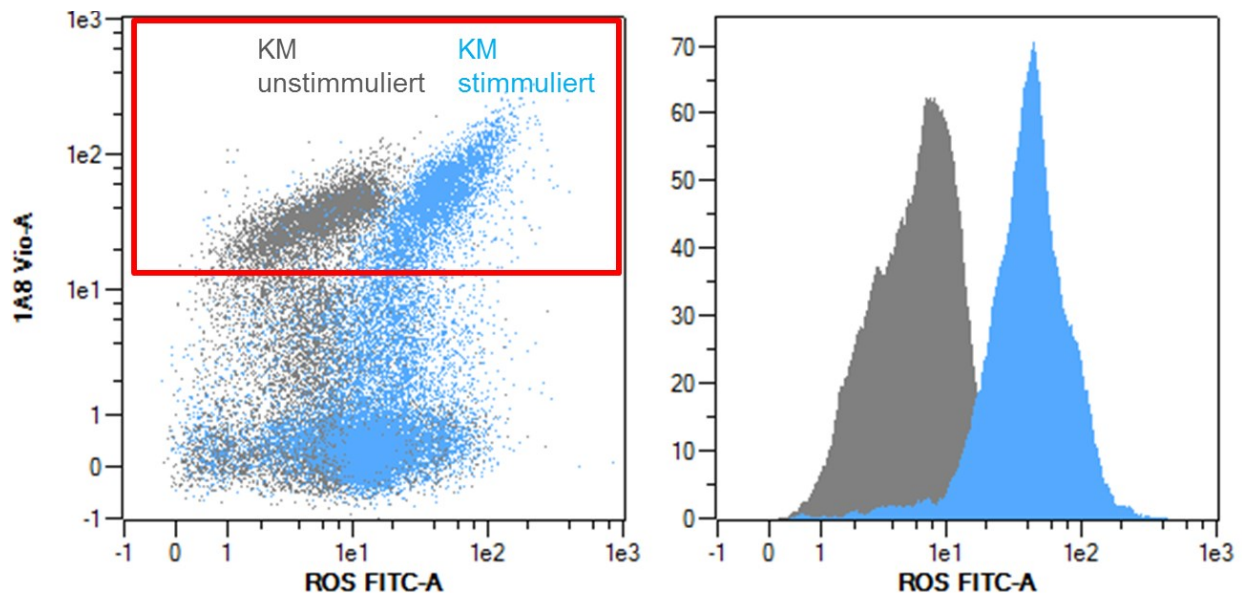


Abbildung 4-4: Durchflusszytometrische Analyse von ROS

Dargestellt ist hier beispielhaft die Analyse der ROS Produktion. Hierfür wurden Proben aus dem Knochenmark (KM) mit dem neutrophilspezifischen Antikörper anti-Ly6G (V450), sowie dem ROS detektierenden Farbstoff CM-H2DCFDA (FITC) gefärbt, wobei ein Teil der Probe zusätzlich als Positivkontrolle mit PMA (blau) stimuliert wurde. Für die Auswertung wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Ly6G positive Zellen (links, rotes Rechteck) im ROS Detektionskanal bestimmt.

Zur Ermittlung der reaktiven Sauerstoffspezies wurde zunächst im FSC/SSC die Population auf die intakten Zellen begrenzt. Ausgehend von der lebenden Zellpopulation wurde in einem weiteren Dotplot (Abb. 4-4) das Signal der ROS-Färbung gegen die NΦ-spezifische Antikörperfärbung aufgetragen, um die ROS-bildenden NΦ zu identifizieren. Die Population wurde mit einem weiteren *Gate* (Abb. 4-4, rotes Rechteck) eingegrenzt und die mittlere Fluoreszenzintensität des ROS-Kanals innerhalb dieses *Gates* ausgelesen.

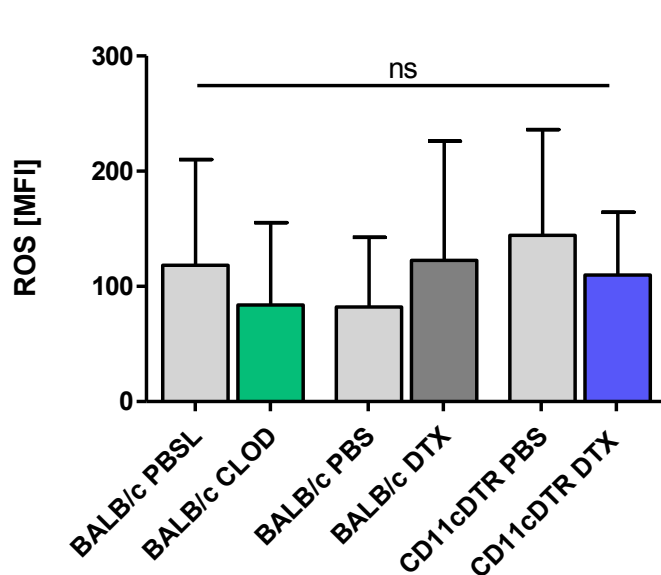


Abbildung 4-5: Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) nach Depletion und steriler Inflammation

Die Bestimmung der ROS-Menge in N Φ erfolgte 6 h nach der i.t. Behandlung der Versuchsgruppen mit KC/MIP-2 [500 ng]. Im Vorfeld wurden dafür BALB/c Mäuse mit Clodronat Liposomen (CLOD, grün) oder PBS Liposomen (PBSL, hellgrau) sowie DTX (dunkelgrau) und PBS (hellgrau) i.t. vorbehandelt. Weiterhin wurden CD11cDTR transgene Mäuse mit PBS (hellgrau) oder DTX (blau) i.t. vorbehandelt. Die Applikation von KC/MIP-2 erfolgte 24 h nach der letzten Vorbehandlung. Für die Auswertung der ROS-Menge, die der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensität entspricht, wurde das in Abb. 4-4 beschriebene Gate verwendet. (n=3, 1way ANOVA Bonferroni's Test)

In den Proben konnten dabei keine signifikanten Unterschiede in der ROS Menge festgestellt werden (Abb. 4-5). Um auszuschließen, dass die Ergebnisse durch das artifizielle Modell der sterilen Inflammation bedingt waren, wurde der Versuchsaufbau für die transgene Linie unter Infektionsbedingungen mit *Aspergillus fumigatus* wiederholt (Abb. 4-6). Im Gegensatz zur sterilen Inflammation war die gemessene ROS Produktion diesmal lediglich halb so hoch. Dennoch konnten auch hierbei keine Unterschiede zwischen den mit PBS- und den mit DTX-behandelten Tieren festgestellt werden. Als Kontrolle für die Wirksamkeit von PMA diente eine unbehandelte Knochenmarkspröbe (Abb. 4-6), die nach Stimulation durch PMA einen signifikant höheren Wert für ROS anzeigte.

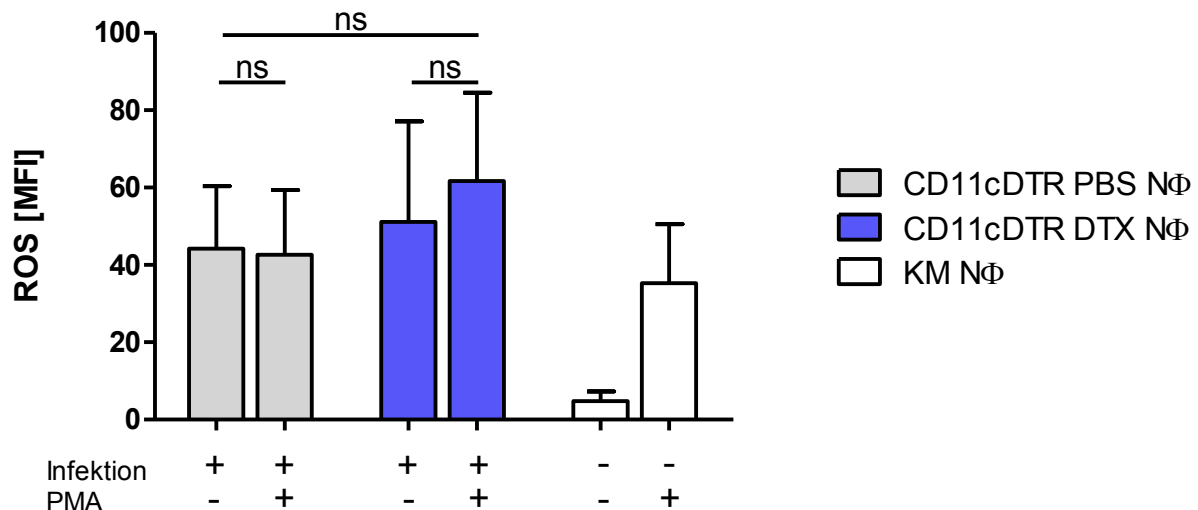


Abbildung 4-6: Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) nach Depletion und Infektion mit *Aspergillus fumigatus*

Nach der Vorbehandlung von CD11cDTR Mäusen mit DTX (blau) oder PBS (grau) wurden die Tiere zusätzlich mit *Aspergillus fumigatus* infiziert und die ROS Produktion in NΦ, ermittelt. Als Kontrolle dienten Knochenmarkszellen (KM) von unbehandelten CD11cDTR Tieren (weiß). Alle Proben (BAL bzw. Knochenmark) wurden 6 h nach der Infektion gewonnen und ein Teil der Proben zusätzlich mit PMA [10 ng/ml] stimuliert. (n = 3; 1way ANOVA Bonferroni Test)

4.1.3 Pro- und Anti-inflammatorische Zytokine

Um die Theorie einer unkontrollierten Neutrophilenreaktion weiter zu untersuchen, sollten im nächsten Versuchsansatz die Konzentrationen von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen in der gesamten Lunge der individuell vorbehandelten Gruppen nach Infektion bestimmt werden. Dazu wurden BALB/c Tiere mit Clodronat oder PBS Liposomen, sowie CD11cDTR Tiere mit DTX oder PBS vorbehandelt und 24 h nach der Depletion mit 5×10^6 Konidien i.t. infiziert. Die Proben wurde nach 8 h Inkubation durch Homogenisierung der gesamten Lunge gewonnen. Die Analyse der Zytokinlevel erfolgte hierbei mittels *Bead*-basierter Multiplexanalyse.

Zunächst wurde dafür die *Bead*-Population im FSC/SSC ausgewählt (Abb. 4-7, links, blauer Kreis) und anschließend die Intensität der *Beads* gegen die Intensität des Detektionsantikörpers aufgetragen. Die Helligkeit der *Beads* gab dabei Aufschluss über die analysierte Zytokingruppe (Intensität im *Capture Beads* Kanal), die Auslenkung im PE-Kanal zeigte die Menge des jeweiligen Zytokins an.

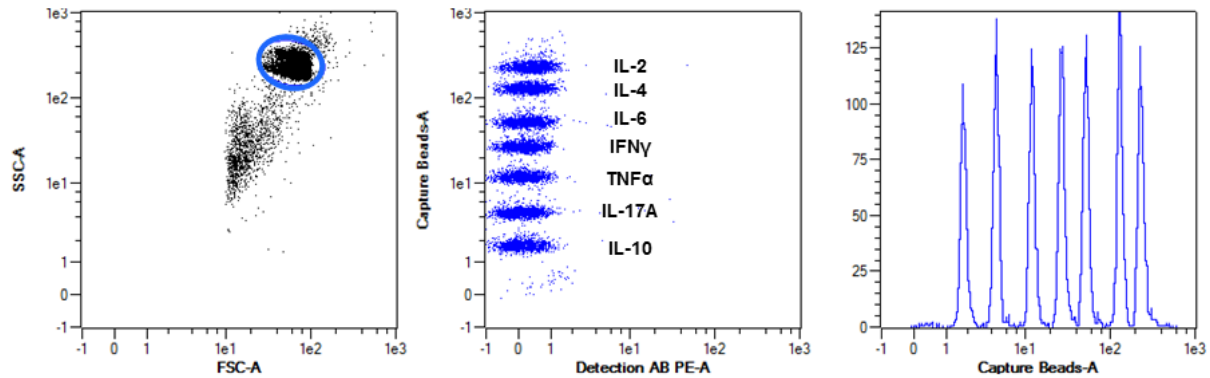
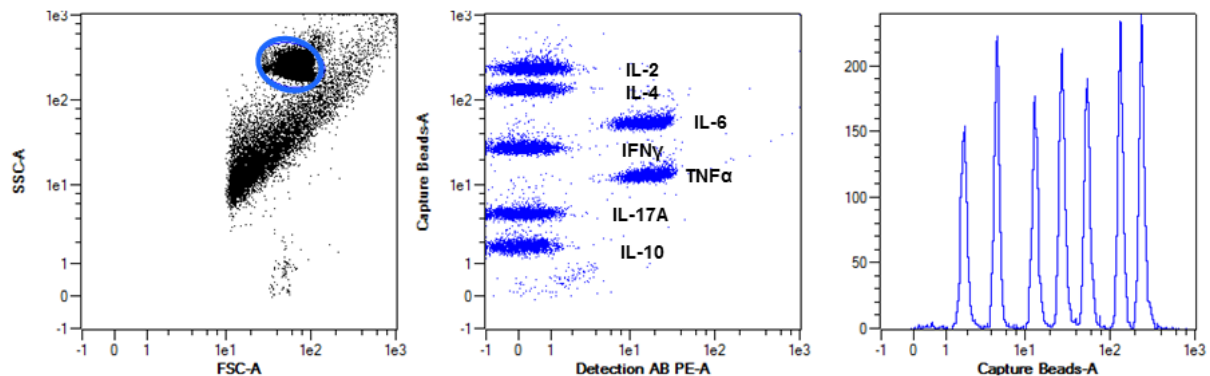
Negativ-Kontrolle**CD11cDTR PBS + Infektion**

Abbildung 4-7: Analyse der Zytokinlevel in der Lunge nach AM Depletion und Infektion mit *Aspergillus fumigatus*

Für die Analyse der Zytokinlevel wurden BALB/c Tiere mit Clodronat oder PBS Liposomen, sowie CD11cDTR Tiere mit DTX oder PBS vorbehandelt und anschließend mit *Aspergillus fumigatus* (5×10^6 Konidien) infiziert. Nach 8 h Inkubation wurden die im Überstand der homogenisierten Lungen befindlichen Zytokine über ein *Bead*-basiertes Multiplexverfahren vermessen. Die *Bead* Population wurde zunächst im SSC/FSC markiert (linke Spalte, blauer Kreis) und die Fluoreszenzkanäle für die *Bead*-Intensität und die Intensität des Detektionsantikörpers gegeneinander aufgetragen (mittlere Spalte). Die Intensität im *Bead*-Kanal gibt dabei das Zytokin an, wohingegen die Steigerung der Intensität im Detektionskanal (Mitte, unten) mit der Menge an gebundenem Zytokin korreliert.

Unstimulierte Negativkontrollen (Abbildung 4-7, oben), bei denen sich im *Capture Beads* Kanal die einzelnen *Bead*-Populationen klar abgrenzen ließen, zeigten keinerlei Auslenkung im Detektionskanal, da die *Beads* keinerlei Zytokine gebunden hatten. Bei Betrachtung einer stimulierten Probe (Abb. 4-7 unten, Mitte) hingegen sah man eine deutliche Auslenkung der Populationen in den Detektionskanal hinein.

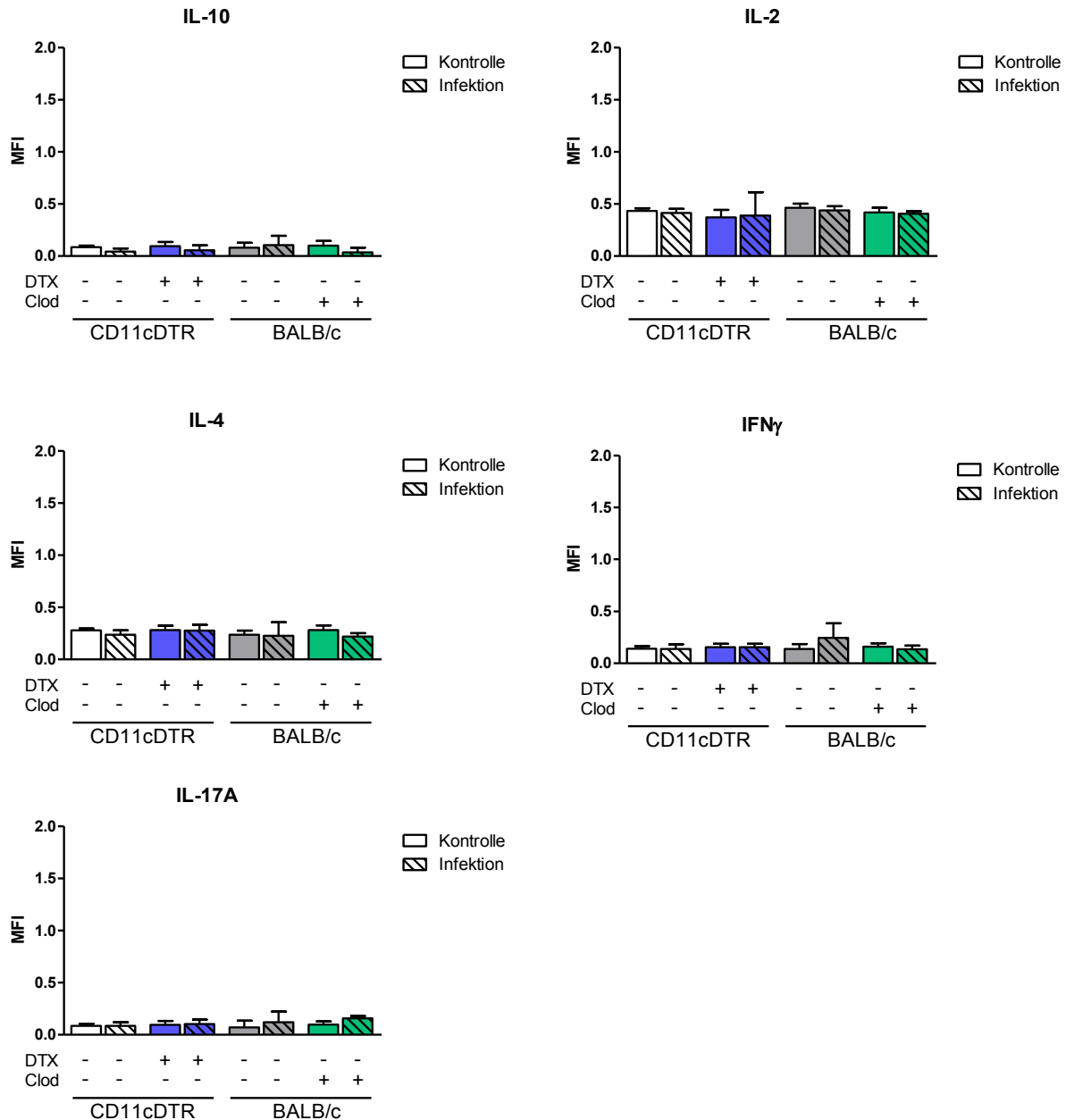


Abbildung 4-8: Analyse der Zytokinmenge in der Lunge nach Depletion und Infektion mit *Aspergillus fumigatus* - IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A und IFN γ

Für die Analyse der Zytokinlevel wurden BALB/c Tiere mit Clodronat (Clod) oder PBS Liposomen, sowie CD11cDTR Tiere mit DTX oder PBS vorbehandelt und anschließend mit *Aspergillus fumigatus* (5×10^6 Konidien) infiziert. Nach 8 h Inkubation wurden die im Überstand der homogenisierten Lungen befindlichen Zytokine über ein *Bead*-basiertes Multiplexverfahren vermessen. (n=3, 1way ANOVA Bonferroni Test)

Zur Bestimmung des Zytokinlevels wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) jeder einzelnen Population für alle gemessenen Proben ausgelesen.

Für die Zytokine IL-2, IL-4, IL-10, IFN γ und IL-17A konnten keine Unterschiede im Vergleich zu den Negativkontrollen festgestellt werden (Abb. 4-8). Die Zytokinlevel

für TNF α und IL-6 hingegen zeigten Unterschiede zwischen den AM depletierten und nicht-depletierten Gruppen.

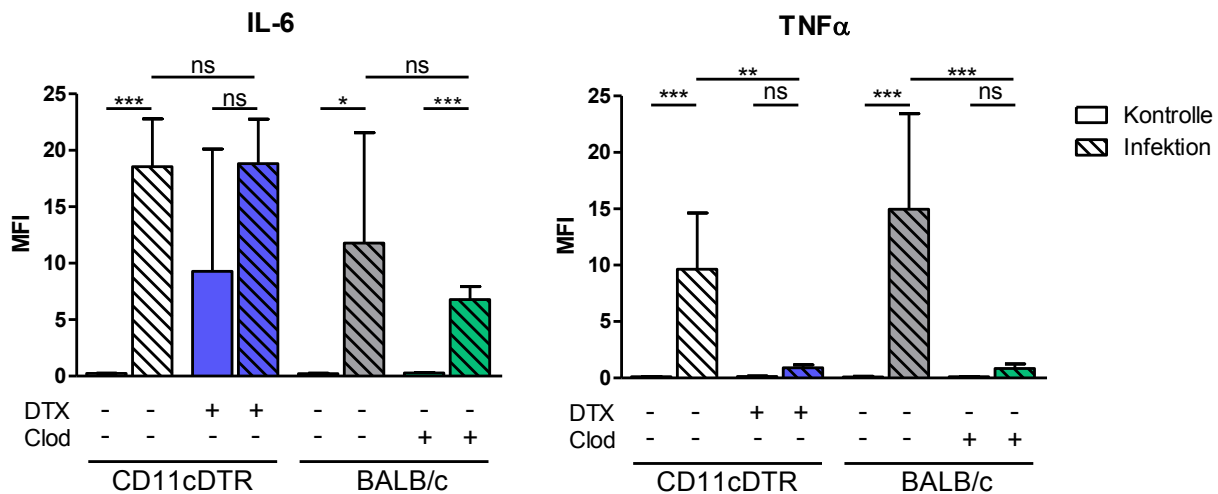


Abbildung 4-9: Analyse der Zytokinmenge in der Lunge nach Depletion und Infektion mit *Aspergillus fumigatus* – TNF α und IL-6

Für die Analyse der Zytokinlevel wurden BALB/c Tiere mit Clodronat (Clod) oder PBS Liposomen, sowie CD11cDTR Tiere mit DTX oder PBS vorbehandelt und anschließend mit *Aspergillus fumigatus* (5×10^6 Konidien) infiziert. Nach 8 h Inkubation wurden die im Überstand der homogenisierten Lungen befindlichen Zytokine über ein *Bead*-basiertes Multiplexverfahren vermessen. ($n = 3$; $p \leq 0,05$; 1way ANOVA Bonferroni Test)

In der TNF α -Messung (Abb. 4-9, rechts) sah man, dass die MFI Werte bei uninfizierten Tieren, ohne zelldepletierende Vorbehandlung kaum ermittelbar war. Bei Betrachtung der ebenfalls unbehandelten, aber mit *Aspergillus* infizierten Gruppen hingegen stiegen die Werte an gemessenem TNF α deutlich an, wobei in den BALB/c Tieren der Anstieg nahezu doppelt so hoch war, wie in den infizierten CD11cDTR Tieren. Dieser Anstieg konnte in den Makrophagendepletierten und infizierten Gruppen in beiden Modellen nicht beobachtet werden. Dies zeigte, dass die Depletion der Makrophagen in beiden Modellen zu einer ausbleibenden Produktion an TNF α nach der Infektion mit *Aspergillus fumigatus* führte.

Bei Betrachtung der Zytokinlevel für IL-6 (Abb. 4-9, links) hingegen fiel auf, dass im Zuge einer Infektion mit *Aspergillus fumigatus* ein Anstieg für dieses Zytokin zu verzeichnen war, unabhängig von der Depletion der Makrophagen. Auffällig war auch das geringere Expressionslevel von IL-6 in den mit Clodronat vorbehandelten, infizierten BALB/c Mäusen. Auch in der nicht vorbehandelten Kontrollgruppe lagen die Werte unterhalb der gemessenen MFIs in den vergleichbaren transgenen Gruppen, möglicherweise ein Effekt, der durch die unterschiedlichen Mauslinien

bedingt war. Eine weitere Auffälligkeit zeigten die DTX-behandelten und uninfizierten CD11cDTR Mäuse. Auch in dieser Gruppe ließ sich ein Anstieg an IL-6 nachweisen, der offensichtlich allein durch die Depletion ausgelöst wurde.

4.2 Fehlende regulatorische Zellen nach Depletion und Infektion

Ausgehend von der These einer unkontrollierten Immunantwort stellte sich die Frage, welche Zellen möglicherweise regulatorisch an diesen Prozessen beteiligt waren und explizit nach der Zelldepletion durch DTX fehlten.

Um potentielle Zellsorten zu identifizieren, wurde zunächst die BAL aller Versuchsgruppen durchflusszytometrisch auf verschiedene Zellpopulationen hin (Tabelle 4-1) untersucht.

Tabelle 4-1: Verwendete Antikörperkombinationen für die Analyse der BAL nach Depletion und Infektion mit *Aspergillus fumigatus*

	Färbung 1	Färbung 2	Färbung 3
erkanntes Antigen	Ly6G	CD11b	CD4
	CD11b	CD11c	CD25
	CD11c	F4/80	FOXP3
	F4/80	MHCII	
	CXCR3	SiglecF	

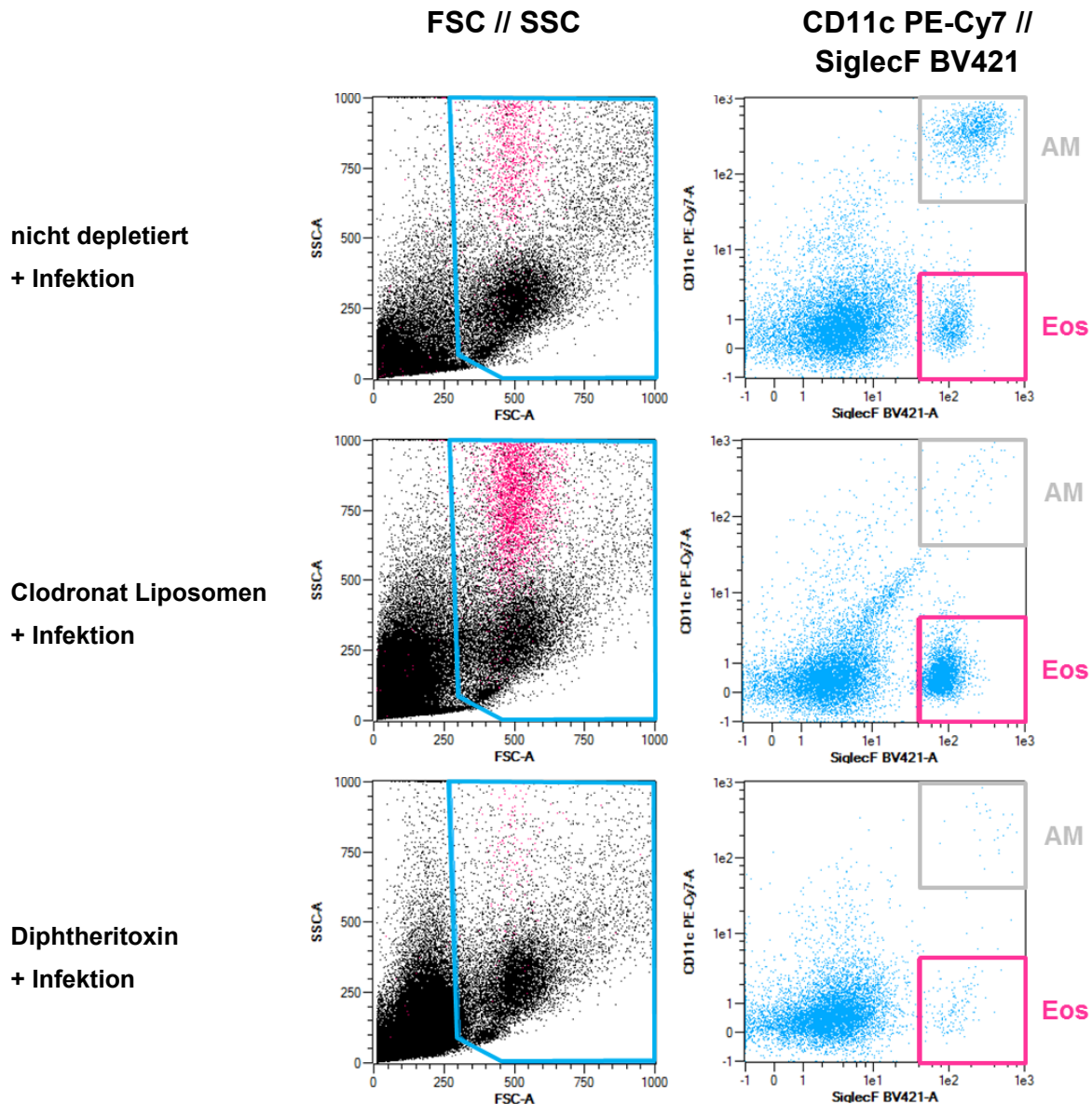


Abbildung 4-10: Durchflusszytometrische Analyse der BAL nach Zelldepletion und Infektion mit *Aspergillus fumigatus*

In der rechten Spalte dargestellt sind die jeweiligen Dotplots für die Antikörper anti-CD11c (y-Achse) gegen anti-SiglecF (x-Achse) nach vorangegangener Selektion der lebenden Zellen (linke Spalte, blaues Polygon, FSC/SSC) und der CD11b positiven Zellen (nicht dargestellt). Zu erkennen sind in der nicht AM-depletierten, infizierten Gruppe eine doppelt positive Population (rechte Spalte, oben rechts), die die Makrophagen darstellte. Zusätzlich erkennbar ist eine SiglecF einfach positive Population (unten rechts, magenta Quadrat), welche die Eosinophilen (Eos) repräsentiert.

Bei der Auswertung der Populationen fielen vorrangig Unterschiede bei einer CD11b+/CD11c-/SiglecF+ Population (Abb. 4-10, magenta Quadrat) auf, die aufgrund der gebundenen Antikörper und der Lage der Zellen im FSC/SSC (Abb. 4-10, magenta Population) als Eosinophile Granulozyten (Eos) identifiziert werden konnten. Diese Population trat ausschließlich unter Infektionsbedingungen auf, fehlte aber nahezu vollständig in den zusätzlich DTX-behandelten Versuchsgruppen (Abb. 4-10, untere Zeile). Die CD11c+/SiglecF+ Population, die die Makrophagen

beschrieb, fehlte erwartungsgemäß in allen AM depletierten Gruppen. Die statistische Analyse zeigte einen signifikanten Verlust der Eosinophilenpopulation im DTX Modell nach Infektion (Abb. 4-11).

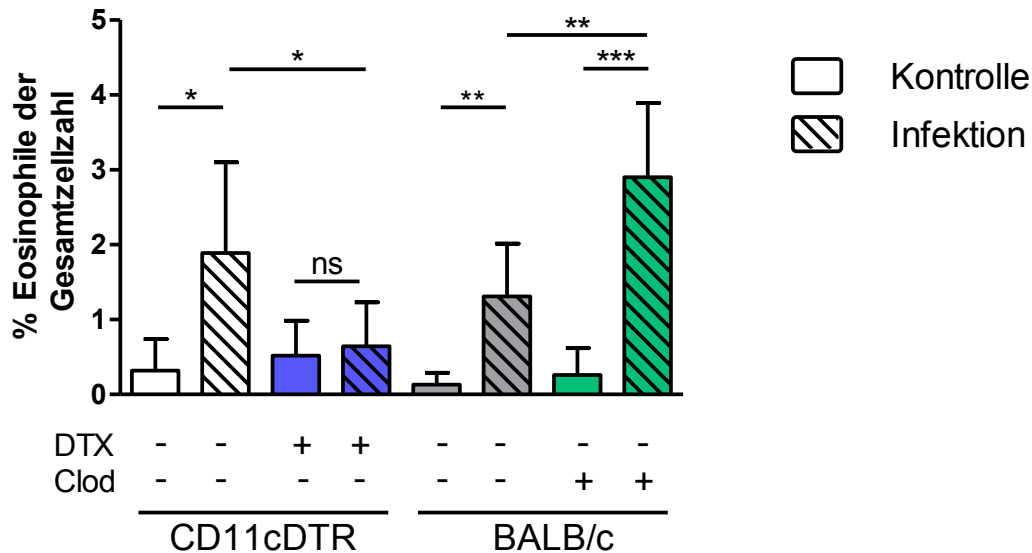


Abbildung 4-11: Eosinophile in der BAL nach AM Depletion und Infektion mit *Aspergillus fumigatus*

BALB/c Mäuse wurden mit Clodronat Liposomen (grün) bzw. PBS Liposomen (grau) vorbehandelt und im Anschluss mit *Aspergillus fumigatus* infiziert. Ebenso wurden CD11cDTR Mäuse mit PBS (weiß) oder DTX (blau) vorbehandelt und mit PBS (leer) oder *Aspergillus* (schraffiert) infiziert. Die Analyse der Eosinophilenpopulation in BAL erfolgte, wie in Abb. 4-10 beschrieben, 24 h nach der Infektion. (n = 3, p ≤ 0,05, Students t-Test, FDR korrigiert)

4.2.1 Blockierung einer Eosinophilenrekrutierung durch anti-IL-5 Antikörper Behandlung

Um zu testen, ob die nicht detektierbare Eosinophilenpopulation möglicherweise einen Einfluss auf die Mortalität im DTX Modell hatte, sollte in einem weiteren Ansatz die Infiltration von Eosinophilen blockiert werden. Durch bisherige Publikationen (Ochkur *et al.*, 2007) war bekannt, dass die Expression von IL-5 sowie Eotaxin-1 und -2 zur Rekrutierung von Eosinophilen über den Chemokin-Motiv-Rezeptor 3 (CCR3) führte. Davon ausgehend wurde zunächst versucht, das Einwandern der Zellen durch die Gabe eines anti-IL-5-Antikörpers zu unterbinden. Der monoklonale anti-IL-5 Antikörper TRFK-5 (Garlisi *et al.*, 1999) verhinderte dabei, dass IL-5 an den Rezeptor binden konnte und inhibierte somit die Rekrutierung der Eosinophilen. Im nachfolgenden Versuch sollte das Einwandern der Eosinophilen im Clodronat Modell unterbunden werden, um im Anschluss durch eine Infektion eine ähnlich hohe Mortalität wie im DTX Modell zu erreichen.

Nach der Vorbehandlung mit Clodronat Liposomen, i.p. Applikation des Antikörpers (bzw. des Isotyps HRPN) und anschließender Infektion mit *Aspergillus* ließen sich tendenziell weniger Eosinophile in den Lungen der anti-IL-5-behandelten (TRFK-5) Versuchsgruppe nachweisen (Abb. 4-12).

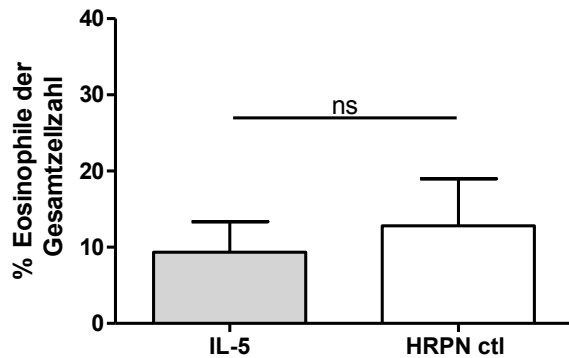


Abbildung 4-12: Eosinophile in der BAL nach anti-IL-5 Behandlung

BALB/c Tiere wurden mit Clodronat Liposomen und anti-IL-5 Antikörper (grau) oder der Isotypkontrolle HRPN (weiß) vorbehandelt und anschließend mit *Aspergillus fumigatus* infiziert. Die Analyse der BAL erfolgte 24 h nach der Infektion. (n = 1, Students t-Test)

Trotz der nicht signifikanten Unterschiede wurde in einem weiteren Versuchsaufbau das Überleben von Clodronat-behandelten BALB/c Mäusen nach der Applikation des anti-IL5 Antikörpers und anschließender Infektion mit *A. fumigatus* untersucht. Als Kontrollen dienten hier zum einen die Isotypkontrolle (HRPN), sowie neutropenische (durch Gabe des NΦ-depletierenden Antikörpers anti-Gr-1, Klon RB6-8C5) und dann infizierte Tiere.

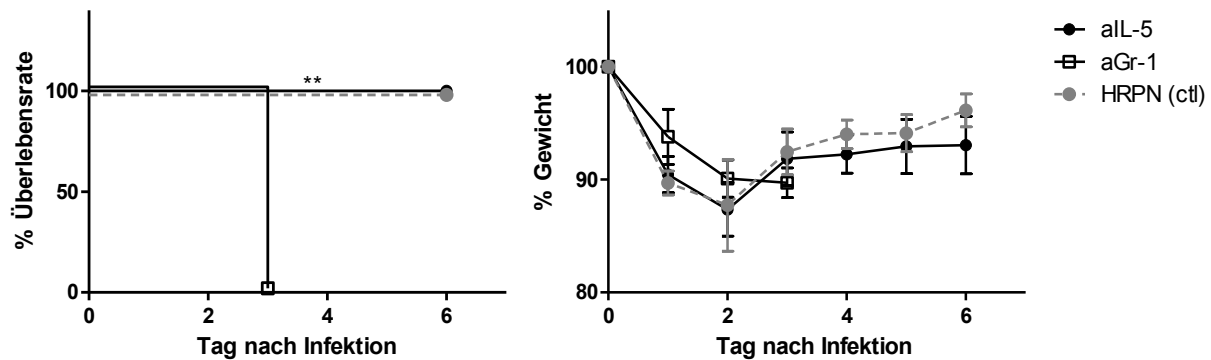


Abbildung 4-13: Überlebens- und Gewichtskurve nach anti-IL-5 Behandlung und Infektion mit *Aspergillus fumigatus*

BALB/c Mäuse wurden mit anti-IL-5 Antikörper und Clodronat Liposomen (Kreis, schwarz), der Isotypkontrolle HRPN und Clodronat Liposomen (Kreis, grau) oder dem NΦ-depletierenden Antikörper anti-Gr-1 i.p. vorbehandelt und anschließend mit *Aspergillus fumigatus* infiziert. Die Gruppen wurden über einen Zeitraum von bis zu 6 Tagen beobachtet und die Überlebensrate bestimmt. (n = 1; p ≤ 0,01; Log-rank Mantel-Cox Test)

Die durch die Gabe des anti-IL-5 Antikörpers erwartete höhere Letalität im Clodronat Modell konnte nicht beobachtet werden (Abb. 4-13). Die Tiere zeigten zwar einen Gewichtsverlust innerhalb der ersten zwei Tage nach Infektion, erholten sich aber ab Tag 2 nach der Infektion wieder. Lediglich die Positivkontrolle, die mit anti-Gr-1 behandelten Tiere, verstarb erwartungsgemäß innerhalb des Beobachtungszeitraums. Die Rekrutierungsblockierung mittels anti-IL-5 Antikörper zeigte demnach keine Wirkung auf die Clodronat behandelte Gruppe und verschlechterte deren Zustand nicht in dem Maß, wie nach DTX Behandlung von CD11cDTR Tieren.

4.2.2 Rekrutierung von Eosinophilen über Eotaxin 2 (CCL24)

Da die Blockierung von Eosinophilen im vorangegangenen Versuch keine signifikante Auswirkung bezüglich der Überlebensrate im Clodronat Modell zeigte, sah ein zweiter Ansatz vor, eine Rekrutierung von Eosinophilen im DTX Modell, zu induzieren und diese Tiere ggf. dadurch zu schützen. Hierfür wurde der CCR3 Ligand Eotaxin-2 (CCL24) (Ochkur *et al.*, 2007) intratracheal appliziert. Bereits in einem Vorversuch dazu, konnte bei einer Gabe von 500 ng CCL24 eine Erhöhung der Anzahl an Eosinophilen in der BAL festgestellt werden (Abb. 4-14).

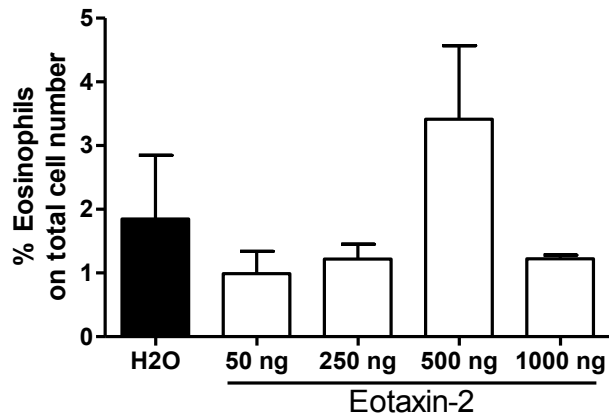


Abbildung 4-14: Rekrutierung von Eosinophilen nach intratrachealer Eotaxin-2 Applikation

AM von CD11cDTR Tieren wurden durch DTX Gabe depletiert und die Mäuse anschließend mit *Aspergillus fumigatus* i.t. infiziert. Zusätzlich erfolgte zum Zeitpunkt der Infektion die i.t. Applikation von Eotaxin-2 in den Konzentrationen 50 ng, 250 ng, 500 ng, 1000 ng, sowie steriles Wasser als Kontrolle. (n = 1; 1way ANOVA Dunnett's Multiple Comparison Test)

4.3 Analyse der DTX Behandlung als Auslöser der Mortalität in CD11cDTR Mäusen

Aufgrund der Tatsache, dass bereits die sterile Inflammation im CD11cDTR Modell zu einer 100 %igen Mortalität führte, stellte sich die Frage, welchen Einfluss das Toxin selbst in diesem Modell haben mochte.

Um diesen zentralen Punkt zu untersuchen, wurde Diphtherietoxin unterschiedlicher Hersteller, Merck und Sigma, miteinander verglichen (siehe Tabelle 4-2, Gruppeneinteilung), wobei die Dosis an verabreichtem Toxin variierte und einige Tiere zusätzlich mit PBS behandelt wurden. Die PBS-Behandlung sollte den Vorgang der experimentellen Infektion imitieren, um zu verifizieren, inwiefern eine weitere Narkose oder eine tracheale Reizung Einfluss nehmen.

Tabelle 4-2: Gruppeneinteilung neues DTX

Gruppe	Linie	DTX Hersteller		Menge	Mock-Infektion (50 µl PBS)
		Sigma	Merck		
1	CD11cDTR	•		100 ng	
2	CD11cDTR	•		50 ng	
3	CD11cDTR	•		100 ng	•
4	CD11cDTR	•		50 ng	•
5	CD11cDTR		•	100 ng	
6	CD11cDTR		•	50 ng	
7	CD11cDTR		•	100 ng	•
8	CD11cDTR		•	50 ng	•
9	BALB/c	•		100 ng	
10	BALB/c	•		100 ng	•
11	BALB/c		•	100 ng	
12	BALB/c		•	100 ng	•

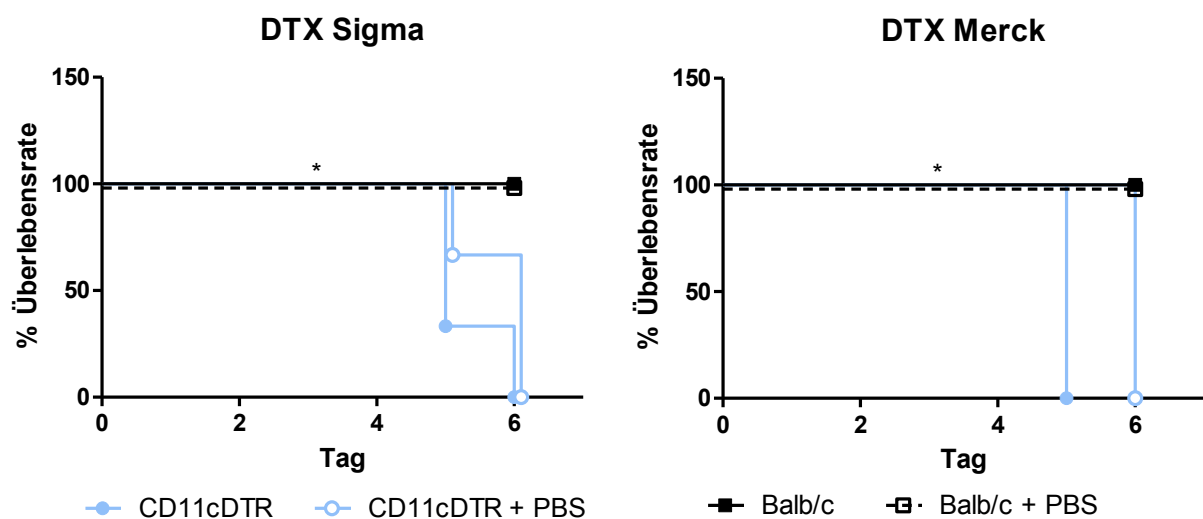


Abbildung 4-15: Überlebenskurve nach AM Depletion mit 100 ng DTX

BALB/c Mäuse (Quadrat, schwarz) sowie CD11cDTR Mäuse (Kreis, blau) wurden mit je 100 ng Diphtherietoxin (DTX) der Firmen Sigma (links) und Merck (rechts) vorbehandelt. Am Tag 1 wurden einige Versuchsgruppen zusätzlich mit 50 µl PBS i.t. behandelt. Die Überlebensrate der Gruppen wurde über einen Zeitraum von bis zu 6 Tagen mit jeweils 3 Tieren pro Gruppe ermittelt. (n = 1; $p \leq 0,05$; Log-rank Mantel-Cox Test)

Dabei zeigten alle DTX-behandelten CD11cDTR Tiere eine 100 %ige Letalität, unabhängig von der Dosis an Toxin oder einer zusätzlichen Reizung durch die erneute Narkose bzw. Applikation von 50 µl PBS (Abb. 4-15). Dies bedeutete, dass

alle CD11cDTR Tiere, die mit DTX vorbehandelt wurden, unabhängig von einer anschließenden Mock-Infektion verstarben. Ein Phänomen welches bisher nicht aufgefallen war, da in den vorangegangenen Überlebensexperimenten die DTX-behandelte, nicht infizierte Gruppe nicht betrachtet wurde. Die Infektion mit *Aspergillus* oder die sterile Infektion mit KC/MIP-2 waren demnach nicht ursächlich für die Letalität im CD11cDTR Modell. Allein die AM Depletion durch DTX Gabe im CD11cDTR Modell reichte aus, um eine letale Wirkung zu erzielen.

4.4 *in vivo* Lungenfunktionstests

Da die Ursache für die letale Wirkung des DTX im CD11cDTR Modell unbekannt war, wurde in Anbetracht der pulmonalen Applikationsroute in erster Linie eine Schädigung der Lunge vermutet. Nicht auszuschließen war hierbei immer noch eine überschießende Immunreaktion durch infiltrierende Immunzellen. Um die potentielle Schädigung der Lunge zu quantifizieren, wurden zusammen mit den Kooperationspartnern Stefan Uhlig und Christian Martin (RWTH Aachen; Institut für Pharmakologie und Toxikologie) Lungenfunktionstests durchgeführt. Da nun bekannt war, dass allein die Depletion die hohe Mortalität auslöste, beschränkte sich der Versuchsaufbau auf folgende vier Gruppen:

1. BALB/c Tiere, behandelt mit 100 ng DTX
2. BALB/c Tiere, behandelt mit PBS
3. CD11cDTR Tiere, behandelt mit 100 ng DTX
4. CD11cDTR Tiere, behandelt mit PBS

Ausgehend von den vorangegangenen Überlebensexperimenten bei denen der Tod der CD11cDTR Tiere im Regelfall 5 Tage nach Applikation des Toxins eintrat, wurde für die Bestimmung der Lungenfunktion der Tag 4 nach Applikation ausgewählt. Dies sollte gewährleisten, dass eine potentielle Schädigung der Lunge bereits möglichst weit vorangeschritten, jedoch nicht letal war.

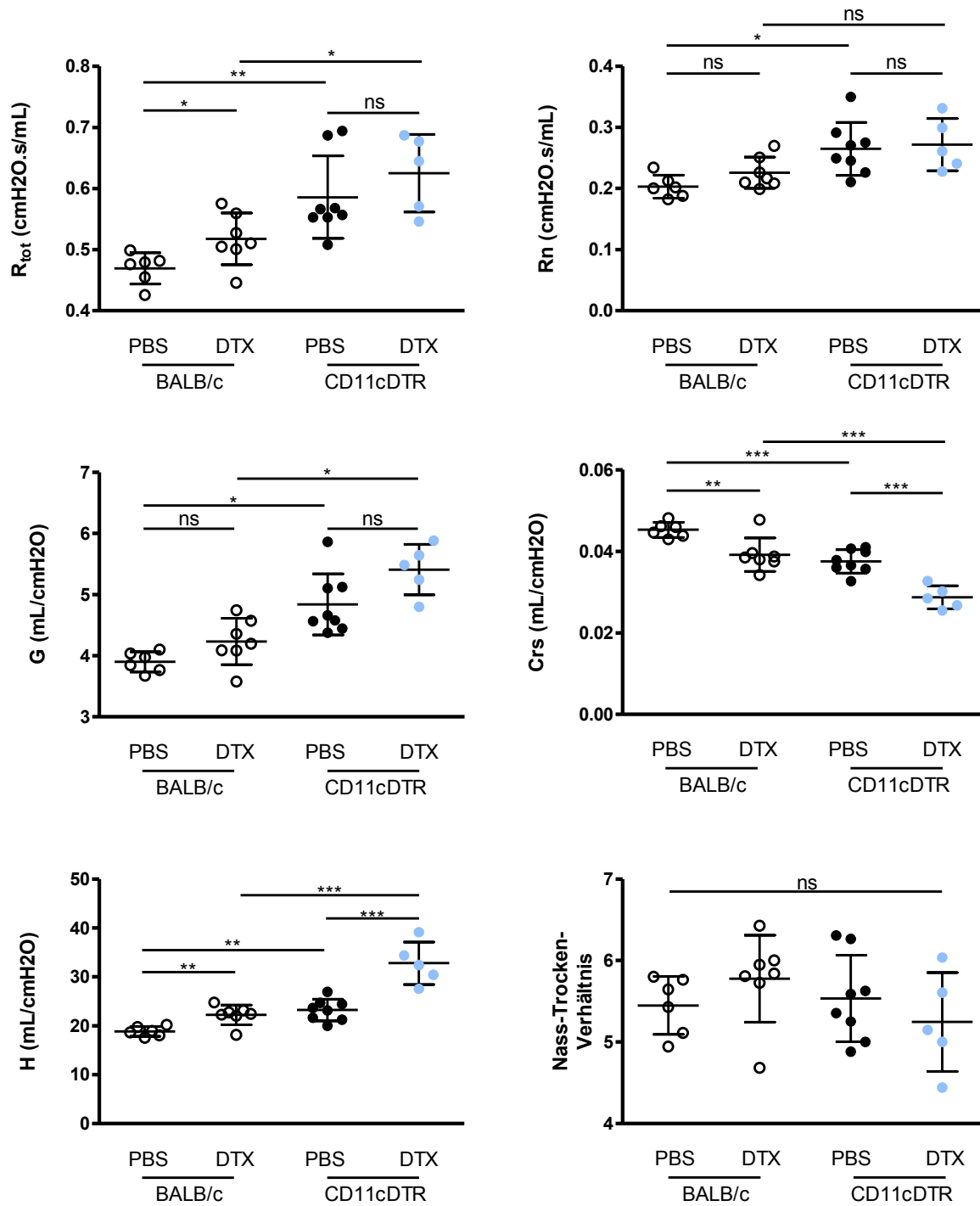


Abbildung 4-16: Lungenfunktionstest nach Behandlung mit DTX

BALB/c Mäuse (leere Kreise) sowie CD11cDTR Mäuse (gefüllte Kreise) wurden mit PBS oder DTX i.t. behandelt. Am Tag 4 nach der Applikation erfolgte die Messung der Lungenparameter „Gesamtwiderstand“ (R_{tot} , oben links), „Widerstand der Zentralenatemwege“ (R_n , oben rechts) und „Gewebswiderstand“ (G , Mitte links). Weiterhin wurde die „Dehnbarkeit des Gewebes“ (Crs , Mitte rechts) und die „Gewebeelastizität“ (H , unten links) ermittelt. ($n = 5$; $p \leq 0,05$; Students t-Test FDR korrigiert)

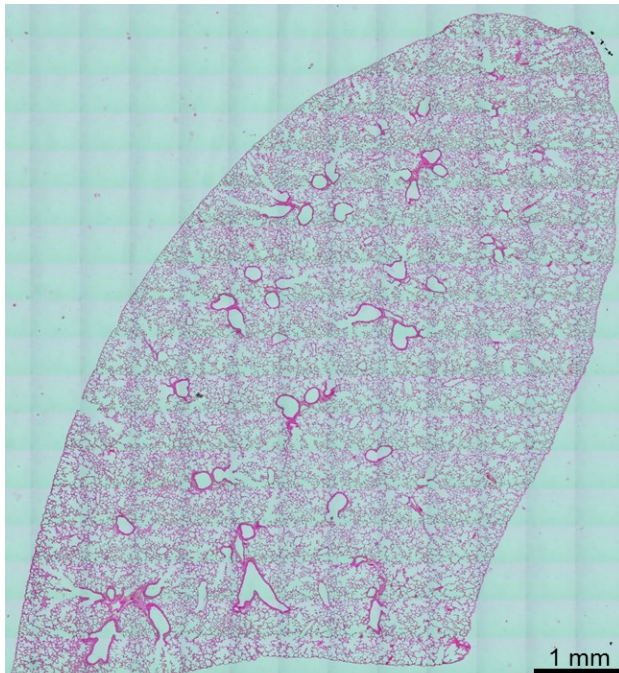
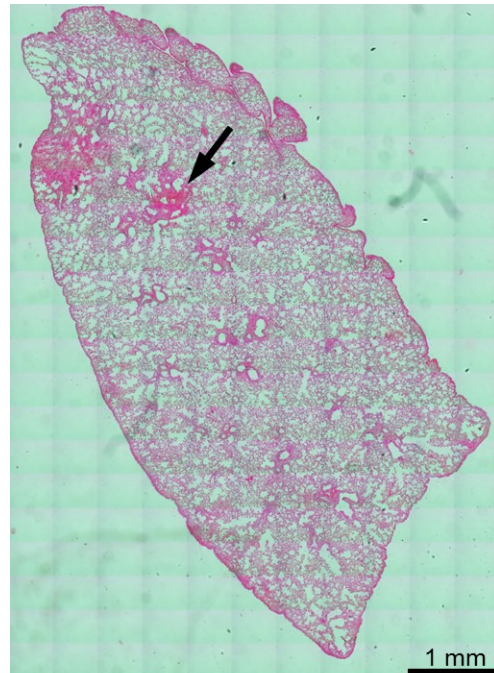
Innerhalb der CD11cDTR Gruppen ließ sich ein leichter Anstieg in den Werten für den Gesamtwiderstand (R_{tot}), für die zentrale Atemwegsresistenz (newtonsche Resistenz, R_n) und für die Geweberesistenz (G) nach DTX Behandlung feststellen (Abb. 4-16). Die Werte spiegelten dabei den Zustand der oberen Atemwege, also der größeren Bronchien, wieder und deuteten auf eine Reizung der oberen Atemwege hin. Der Anstieg zwischen den PBS-behandelten und DTX-behandelten CD11cDTR Mäusen war dabei nicht signifikant. Für die kleinen Atemwege hingegen konnte eine signifikante Verschlechterung der Werte (Crs – Dehnbarkeit, H – Gewebselastizität) nach DTX Applikation beobachtet werden.

Bei Betrachtung der BALB/c Tiere fiel zunächst auf, dass Lungen nach PBS Behandlung deutlich weniger Reizungen als im CD11cDTR Modell aufwiesen (Abb. 4-16). Dennoch zeigten auch die BALB/c Tiere nach DTX Behandlung eine Verschlechterung der Lungenparameter, die für die kleinen Atemwegsparameter Crs und H ebenfalls signifikant waren (Abb. 4-16, Mitte rechts, unten). Beim Vergleich der beiden Mauslinien nach DTX Behandlung ließ sich feststellen, dass die Verschlechterung der Lungenparameter bei beiden Gruppen dieselben Tendenzen zeigte. Auch das Nass-Trocken-Verhältnis (Abb. 4-16, unten rechts) des *lobus accessorius*, welches als Indikator für Ödeme gilt, änderte sich zwischen den unterschiedlich vorbehandelten Gruppen nicht.

Trotz der Änderungen der Lungenparameter wurden die Auffälligkeiten dieser Werte jedoch als nicht groß genug eingestuft, um die Lungenfunktion nachhaltig so zu inhibieren, dass die DTX-behandelten CD11cDTR Tiere daran verstarben.

4.5 Strukturelle Unterschiede in der Lunge – histologische Analyse

Innerhalb der Versuchsreihe der Lungenfunktionstests wurden auch histologische Präparate des linken Lungenflügels angefertigt. Nach der Fixierung durch PFA (4 %) und Einbettung in Paraffin wurden die einzelnen Lungenflügel in 5 μm dicken Schnitten auf Glasobjektträger überführt und Gewebestrukturen durch eine H&E Färbung angefärbt.

CD11cDTR – PBS**CD11cDTR - DTX****Abbildung 4-17: H&E Färbung von histologischen Lungenpräparaten - Übersicht**

CD11cDTR Mäuse wurden mit PBS (links, 20 x) oder DTX (rechts, 20 x) vorbehandelt und 96 h nach der AM Depletion histologische Präparate der Lunge angefertigt. In den DTX-behandelten Tieren lassen sich bereits auf der Übersichtsaufnahme Veränderungen an den Lungenrändern sowie Einblutungen in das Gewebe (Pfeil) erkennen.

Auf den Übersichtsbildern (Abb. 4-17) der PBS- (links) bzw. DTX-behandelten (rechts) CD11cDTR Tiere (TG) wurde bereits ersichtlich, dass es zumindest in einigen Bereichen der Lunge nach DTX Behandlung zu massiven Infiltrationen von Zellen sowie Einblutungen kam (Pfeil). Generell erschienen die Lungenflügel DTX-behandelter Tiere kondensierter, wobei die Ränder der Flügel weniger glatt und deutlich rötlicher erschienen, was auf ein vermehrtes Auftreten von Zellen in diesen Bereichen hindeutete.

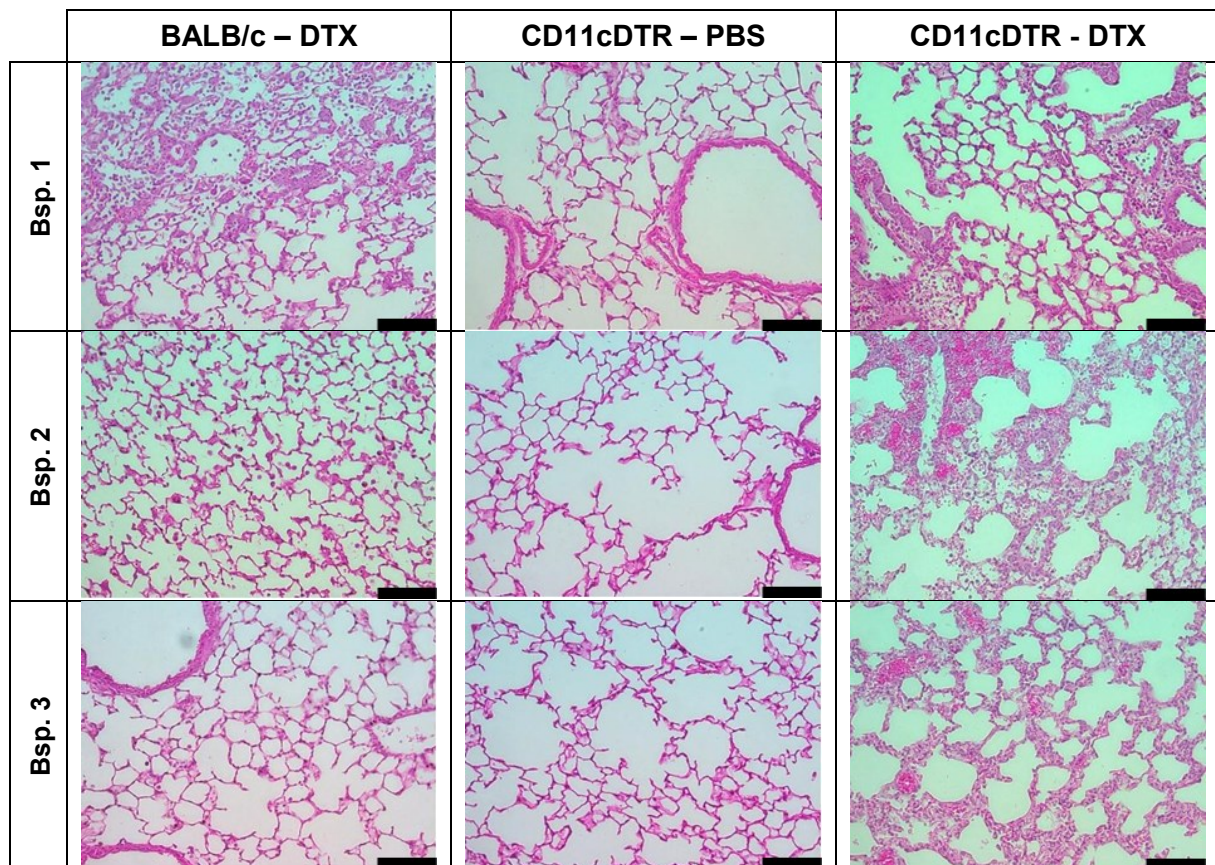


Abbildung 4-18: H&E Färbung von histologischen Lungenpräparaten (20 x)

CD11cDTR Mäuse wurden mit PBS (Mitte) und DTX (rechts), sowie BALB/c Mäuse mit DTX (links) vorbehandelt. Die Präparate wurden 96 h nach der AM Depletion angefertigt und repräsentieren verschiedene Auffälligkeiten im Lungengewebe. (Größenbalken entspricht 100 µm)

Detaillierte Aufnahmen (Abb. 4-18) zeigten, dass sowohl in den WT Tieren (Abb. 4-18, linke Spalte) als auch in den transgenen Tieren, nach DTX Behandlung, in einigen Bereichen zelluläre Infiltrate auftraten. Im Fall der CD11cDTR Tiere nach DTX Behandlung kam es allerdings nicht nur zum Einwandern von Zellen in die Alveolen, auch im Interstitium ließen sich vermehrt Zellen erkennen, wodurch die Alveolarwände deutlich verdickt wirkten (Abb. 4-19, rechts).

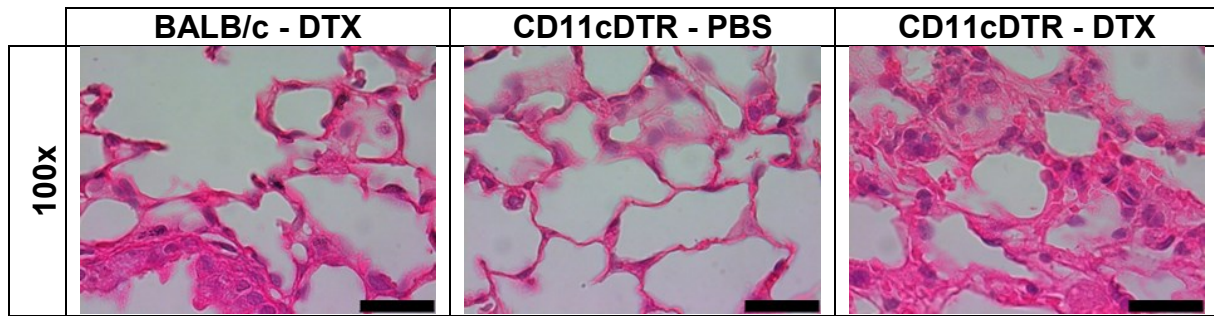


Abbildung 4-19: H&E Färbung von histologischen Lungenpräparaten (100 x)

96 h nach der AM Depletion durch DTX Gabe von BALB/c WT Tieren (links) und CD11cDTR Tieren (rechts) sowie der Behandlung von CD11cDTR Mäusen mit PBS (Mitte) wurden histologische Präparate der Lungen angefertigt, wobei in den CD11cDTR Tieren nach DTX eine Infiltration des Interstitiums zu beobachten war. (Größenbalken entspricht 25 µm)

Wie auch die Analyse der Lungenfunktionsparameter ergaben die histologischen Befunde zwar eine präsente Schädigung des Lungengewebes, welche allerdings nicht schwerwiegend genug war, um die letale Wirkung im CD11cDTR Modell zu erklären.

4.6 Strukturelle Unterschiede in der Lunge – hochauflösende Analyse

Unabhängig von der klassischen Analyse der Lungenstruktur durch die Auswertung histologischer Präparate, sollte die hochauflösende Mikroskopie mittels Rasterelektronenmikroskop (REM) Informationen zum strukturellen Aufbau der Lunge nach DTX Behandlung liefern. Dabei waren in der CD11cDTR Lunge 48 h nach der Depletion mit DTX vermehrt Ablagerungen auf der Innenseite der Alveolen zu erkennen (Abb. 4-20/21, rote Pfeilköpfe), wohingegen die Alveolen der unbehandelten BALB/c Probe glatt und ohne Ablagerungen erschienen. Zusätzlich zeigten sich in einigen Bereichen Risse (Abb. 4-20/21, gelbe Pfeile) in den Alveolarwänden, die den Anschein erweckten, als würde sich der Zellverband an dieser Stelle auflösen. Eine weitere Beobachtung betraf die Struktur der Kapillaren, die im Interstitium verliefen und an den präparationsbedingten Bruchkanten der Probe einsehbar waren (Abb. 4-22, rote Pfeile). Dabei wies die unbehandelte Probe eine glattere Innenseite der Kapillaren auf, wohingegen in der DTX-behandelten Probe eine eher gelappte Oberfläche in den Kapillaren zu sehen war.

Generell ließen die Proben aber keine schwerwiegenden Lungenschäden erkennen.

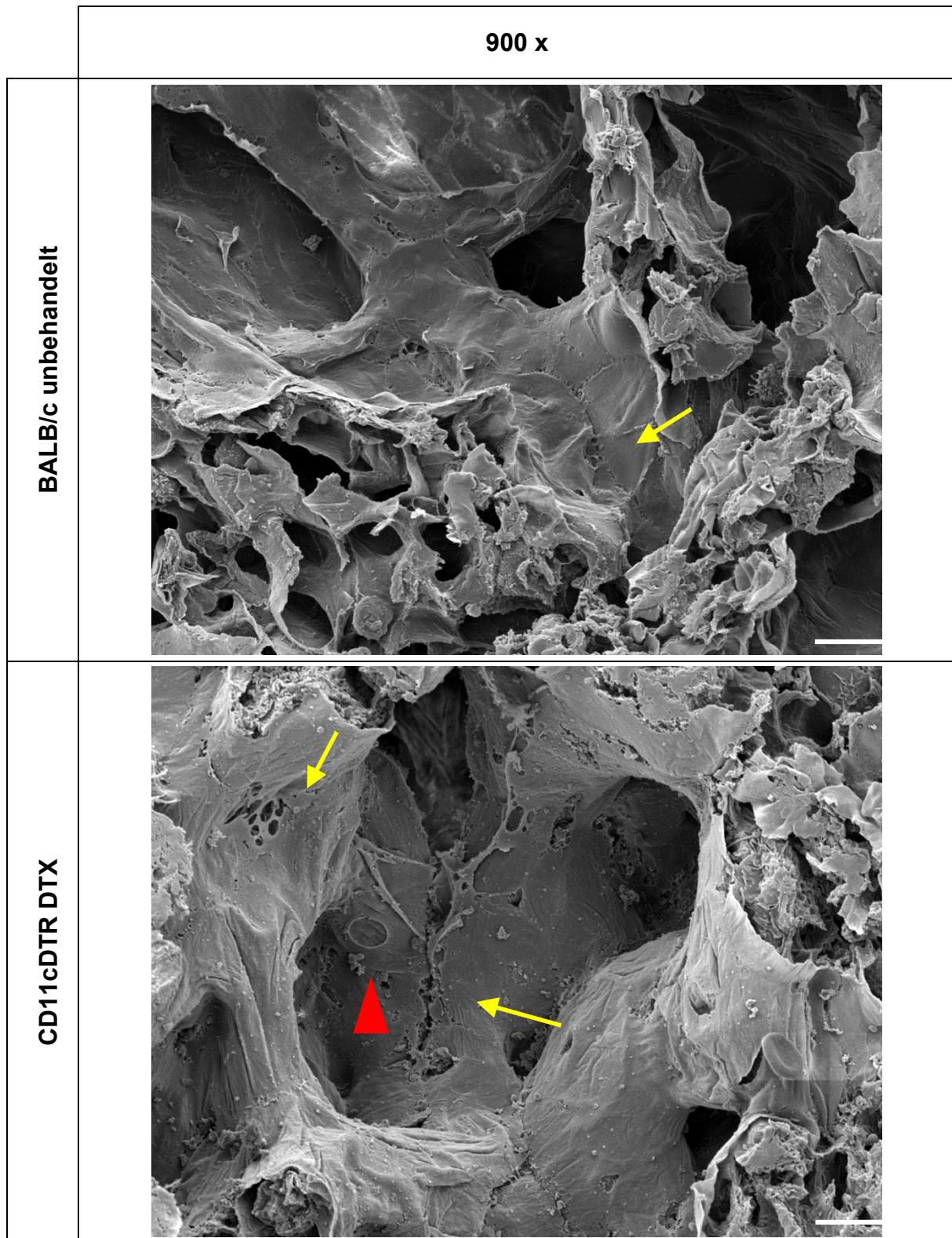


Abbildung 4-20: REM Aufnahme der Lunge 48 h nach AM Depletion – 900 x

Die Lungenstruktur von unbehandelten BALB/c Mäusen und AM depletierten CD11cDTR Mäusen zeigte nach 48 h Inkubation Unterschiede. Neben Ablagerungen (rote Pfeilköpfe) in den Alveolen der DTX-behandelten Tiere lassen sich deutliche Risse (gelbe Pfeile) erkennen. (Größenbalken entspricht 15 µm)

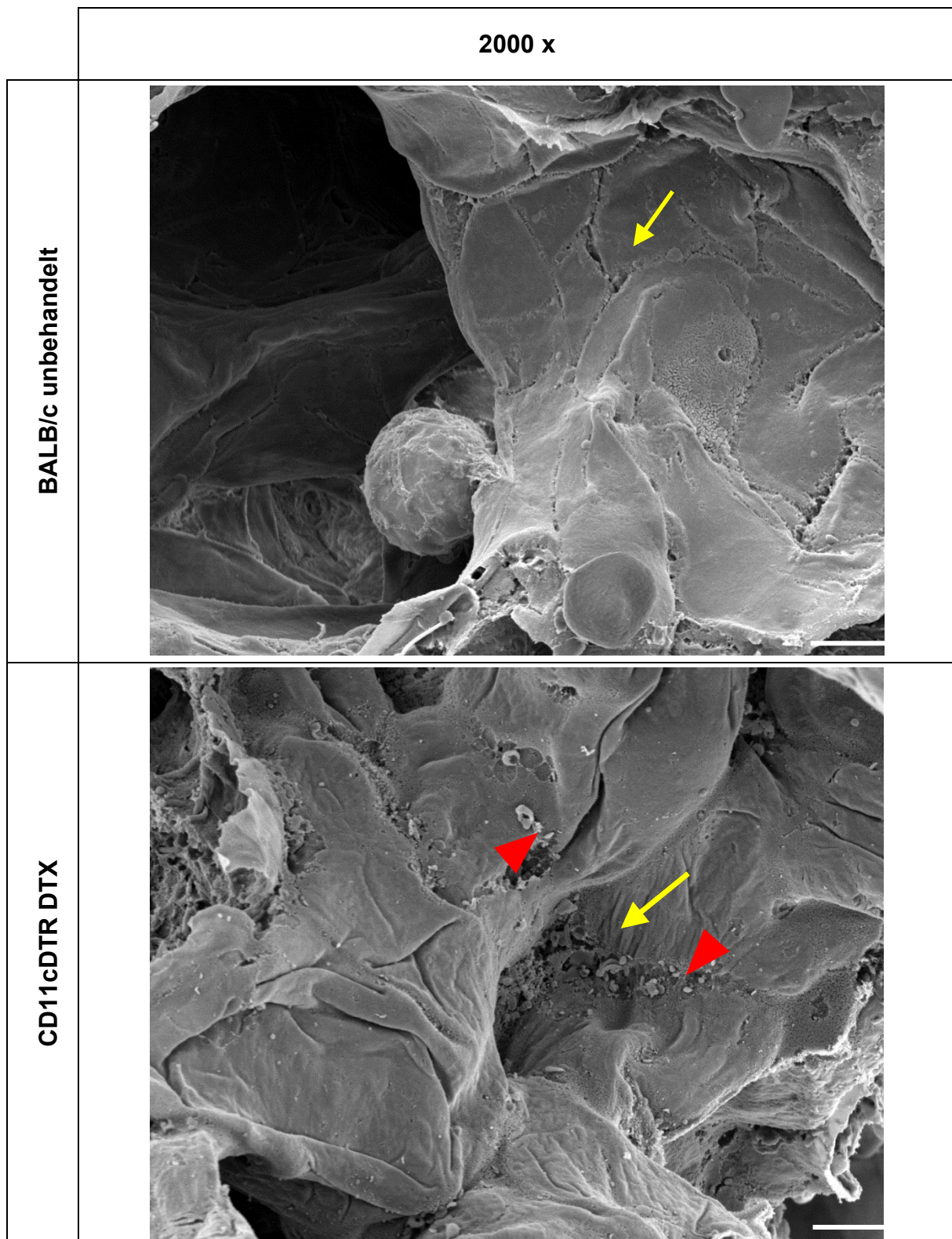


Abbildung 4-21: REM Aufnahme der Lunge 48 h nach AM Depletion – 2000 x

Die Lungenstruktur von unbehandelten BALB/c Mäusen (oben) und AM depletierten CD11cDTR Mäusen zeigt nach 48 h Inkubation Unterschiede. Neben Ablagerungen (rote Pfeilköpfe) in den Alveolen der DTX-behandelten Tiere lassen sich deutliche Risse (gelbe Pfeile) erkennen. (Größenbalken entspricht 7,5 µm)

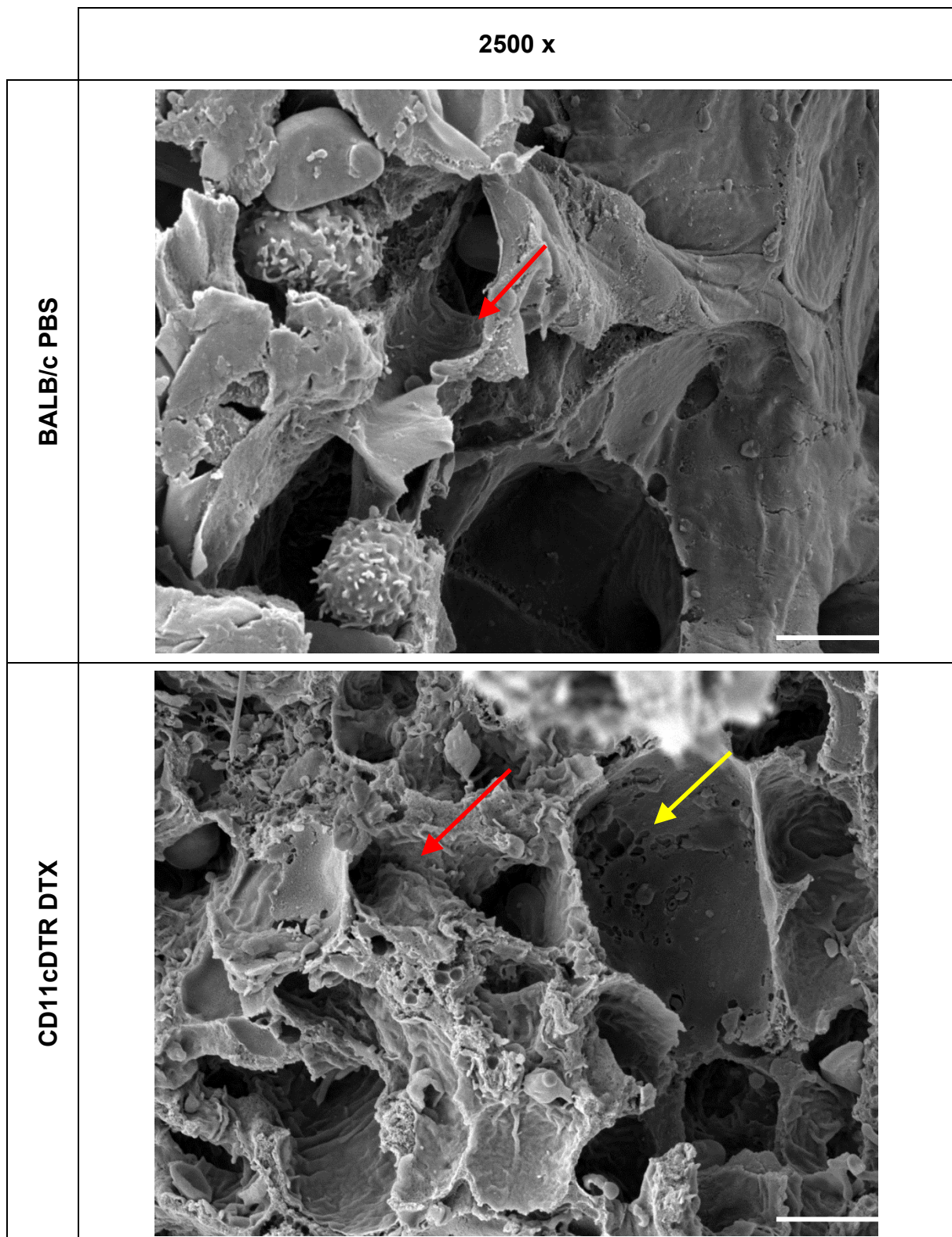


Abbildung 4-22: REM Aufnahme der Lunge 48 h nach AM Depletion – 2500 x

Neben deutlich hervortretenden Rissen im Gewebe (gelbe Pfeile) der DTX-behandelten Mäuse wirken die Innenseiten der Kapillaren im Interstitium weniger glatt (rote Pfeile), als in den PBS-behandelten Kontrolltieren. (Größenbalken entspricht 7,5 µm)

4.7 Blutbild nach AM Depletion

Zusätzlich zu den strukturellen Analysen durch REM und Histologie wurde im Anschluss an die Lungenfunktionstests das Blut der unterschiedlich behandelten Versuchstiere untersucht.

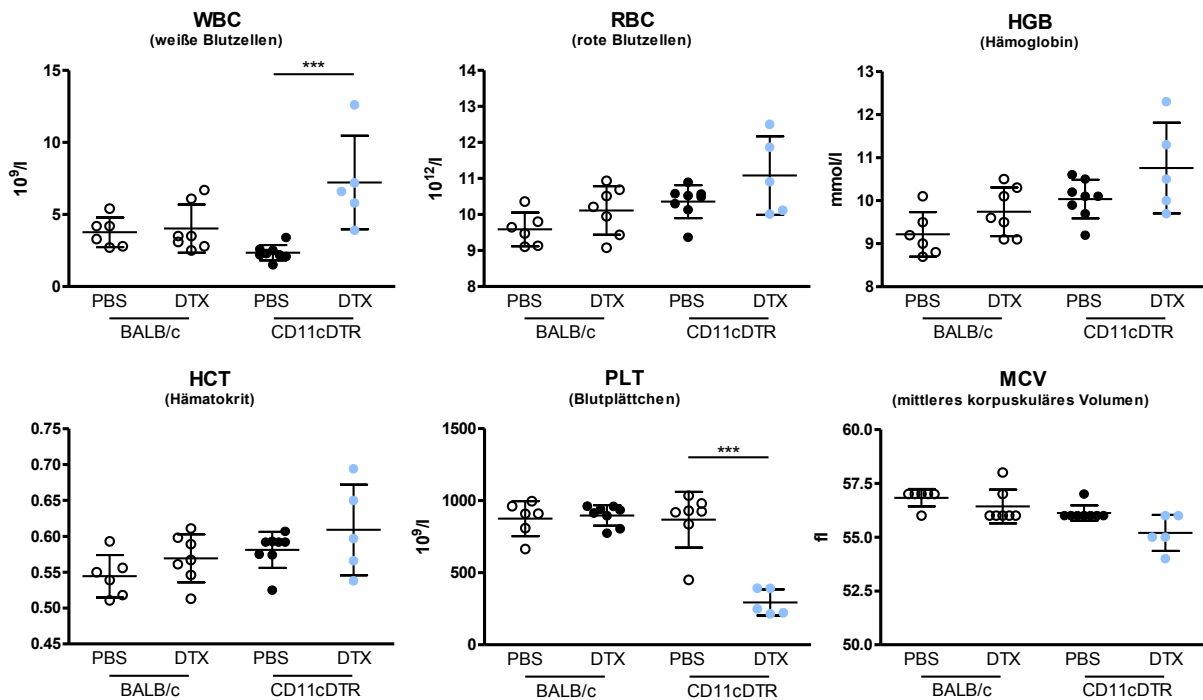


Abbildung 4-23: Blutbild nach AM Depletion durch DTX Gabe

BALB/c Mäuse und CD11cDTR Mäuse wurden mit 100 ng DTX i.t. vorbehandelt, Kontrolltiere wurden mit 100 μ l PBS i.t. behandelt. Die Blutentnahme erfolgte an der *arteria carotis* 96 h nach der Depletion. Dabei wurde die Anzahl an weißen Blutzellen (obere Reihe, links), roten Blutzellen (oben, Mitte) und Hämoglobin (rechts) pro Liter Blut bestimmt. Ebenfalls gemessen wurde der Hämatokritwert (unten links), sowie die Anzahl an Blutplättchen (unten Mitte) pro Liter Blut und das mittlere korpuskuläre Volumen der roten Blutzellen (unten rechts). (n = 5-8, $p \leq 0,05$, 1way ANOVA Bonferroni Test)

Hier konnte nachgewiesen werden, dass sich die Infiltration der Lunge auch in der Zahl an Leukozyten im Blut widerspiegelte. So konnte nach der AM Depletion im transgenen Modell gezeigt werden, dass die Anzahl an Leukozyten nahezu doppelt so hoch war wie bei PBS-behandelten, transgenen Tieren (Abb. 4-23, oben rechts). Auch in der Anzahl der roten Blutkörperchen gab es Unterschiede bei der transgenen, DTX-behandelten Gruppe. Hier konnte ein Anstieg der roten Blutkörperchen gezeigt werden, der beispielsweise durch Dehydrierung der Tiere ausgelöst worden sein könnte. Eine durchaus wahrscheinliche Begründung, die sich aus dem Allgemeinzustand und dem Gewichtsverlust der Tiere nach der AM Depletion ableiten ließ. Die Tiere wirkten apathisch und unterernährt. Ebenfalls

auffällig war die Abnahme der Thrombozyten im Blut, deren Anzahl in der transgenen, DTX-behandelten Gruppe drastisch von 9×10^{11} pro Liter um knapp 2/3 auf lediglich rund 3×10^{11} Zellen pro Liter abfiel (Abb. 4-23, unten Mitte).

Der allgemeine Anstieg an Leukozyten wurde zusätzlich noch in distinkte Leukozytensubpopulationen unterschieden (Abb. 4-24). Bei Betrachtung der Zellzahl pro Kubikmillimeter ließ sich ein Anstieg an Monozyten (Abb. 4-24, Mitte) um das Siebenfache zwischen der PBS-behandelten und der DTX-behandelten, transgenen Gruppe erkennen. Auch die Anzahl der Granulozyten (Abb. 4-24, rechts) stieg um das 7fache von durchschnittlich $0,65 \times 10^3/\text{mm}^3$ auf $4,56 \times 10^3/\text{mm}^3$, eine Beobachtung, die in den Kontrollgruppen nicht nachvollzogen werden konnte. Die Anzahl der Lymphozyten im Blut zeigte in den transgenen Tieren keine signifikante Änderung zwischen den DTX-behandelten Tieren und der Kontrollgruppe, jedoch fiel auf, dass der Basalwert an Lymphozyten in PBS-behandelten Tieren deutlich geringer war als in der äquivalent behandelten WT Gruppe.

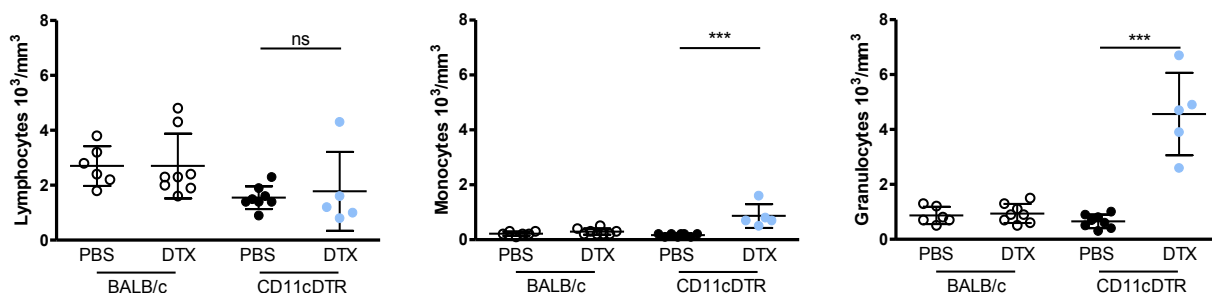


Abbildung 4-24: Quantifizierung der Leukozyten im Blut nach Behandlung mit DTX

BALB/c Mäuse und CD11cDTR Mäuse wurden mit 100 ng DTX, Kontrolltiere wurden mit 100 μl PBS i.t. behandelt. Die Blutentnahme erfolgte an der *arteria carotis* 96 h nach der AM Depletion. Gemessen wurde hierbei die Anzahl an Lymphozyten (links), Monozyten (Mitte) und Granulozyten (rechts) in den BALB/c Kontrollgruppen (leere Kreise) sowie den PBS-behandelten (schwarze Kreise) und DTX-behandelten (blaue Kreise) CD11cDTR Mäusen. ($n = 5-8$; $p \leq 0,001$; 1way ANOVA Bonferroni Test)

4.8 Blutgasanalyse nach AM Depletion

Neben den zellulären Aspekten der Blutanalyse wurde auch die biochemische Zusammensetzung analysiert. Dabei wurden u.a. Parameter wie pH-Wert und Sauerstoffstoffsättigung direkt nach Euthanasie des Versuchstieres bestimmt.

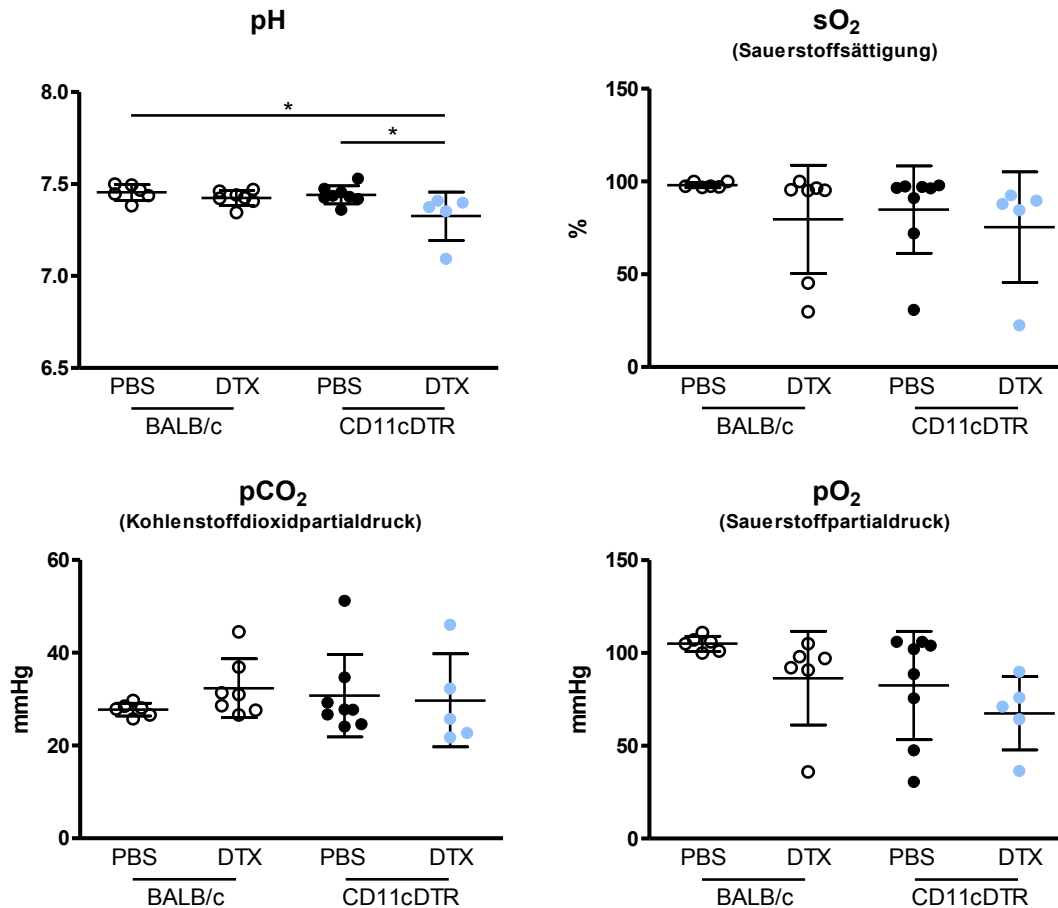


Abbildung 4-25: Blutgasanalyse nach Behandlung mit DTX

BALB/c Mäuse und CD11cDTR Mäuse wurden mit 100 ng DTX, Kontrolltiere wurden mit 100 µl PBS i.t. behandelt. Die Blutentnahme erfolgte an der *arteria carotis* 96 h nach der Depletion. Dabei zeigen sich tendenziell Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen (Kreise leer, Kreise schwarz) und den DTX-behandelten CD11cDTR Mäusen (Kreise blau). Neben dem pH-Wert (oben links) wurden die Partialdrücke für Kohlenstoffdioxid (unten links) und Sauerstoff (unten rechts) sowie die Sauerstoffsättigung (oben rechts) ermittelt. (n = 5-8; p ≤ 0,05; 1way ANOVA Bonferroni Test)

Bei der Analyse des pH-Wertes (Abb. 4-25, oben links) im Blut wurde deutlich, dass die DTX-behandelten CD11cDTR Tiere eine Übersäuerung des Blutes (Azidose) aufwiesen. Bei einer Azidose sinkt der pH-Wert des Blutes durch eine Störung des Säure-Base-Haushaltes, ausgelöst beispielsweise durch einen Überschuss an Kohlendioxid. Allerdings konnten in allen vier Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede für den partialen Kohlendioxiddruck (Abb. 4-25, unten links) nachgewiesen werden, weswegen eine pulmonal bedingte Ursache als Auslöser der Azidose als unwahrscheinlich galt. Hingegen kam es bei den Werten von Bikarbonat (Abb. 4-26, HCO_3^- , oben rechts) und der Basenabweichungen SBEc (*standard base excess corrected* – korrigierte Standardbasenabweichung) (Abb. 4-26, unten) zu einer signifikanten Verminderung in den transgenen Tieren nach DTX Behandlung.

Die Basenabweichung beschreibt dabei die Pufferkapazität des Blutes durch Bestandteile wie Bikarbonat und Hämoglobin. Um den metabolischen Zustand eines Patienten zu bestimmen wird das Blut *in vitro* daher mit Säure oder Base versetzt wobei die Menge an benötigter Säure/Base bis zum Erreichen des pH-Wert 7,4 (Normwert bei standardisierten Bedingungen) bestimmt wird. Eine Abweichung in den negativen Bereich bedeutet daher, dass zu wenig Basen (z.B. Bikarbonat) und damit eine Azidose vorliegt, wie im Fall der DTX-behandelten, transgenen Versuchsgruppe (-10 mmol/l) gezeigt werden konnte. Zusammen mit den gefallenem Bikarbonatwerten und den gleichbleibenden Kohlenstoffdioxidpartialdrücken deuteten die gemessenen Blutwerte auf eine metabolische Ursache der Azidose hin, da bei einer pulmonalen Azidose ein starker Anstieg des Kohlenstoffdioxidpartialdruckes charakteristisch gewesen wäre. Ursächlich hierfür ist, dass das Gas im Falle einer pulmonalen Azidose nicht abgeatmet werden kann. Dabei erhöhen sich die Werte für $p\text{CO}_2$, was wiederum zu einer Übersäuerung des Blutes, also abfallendem pH- und CHCO_3 -Wert führt.

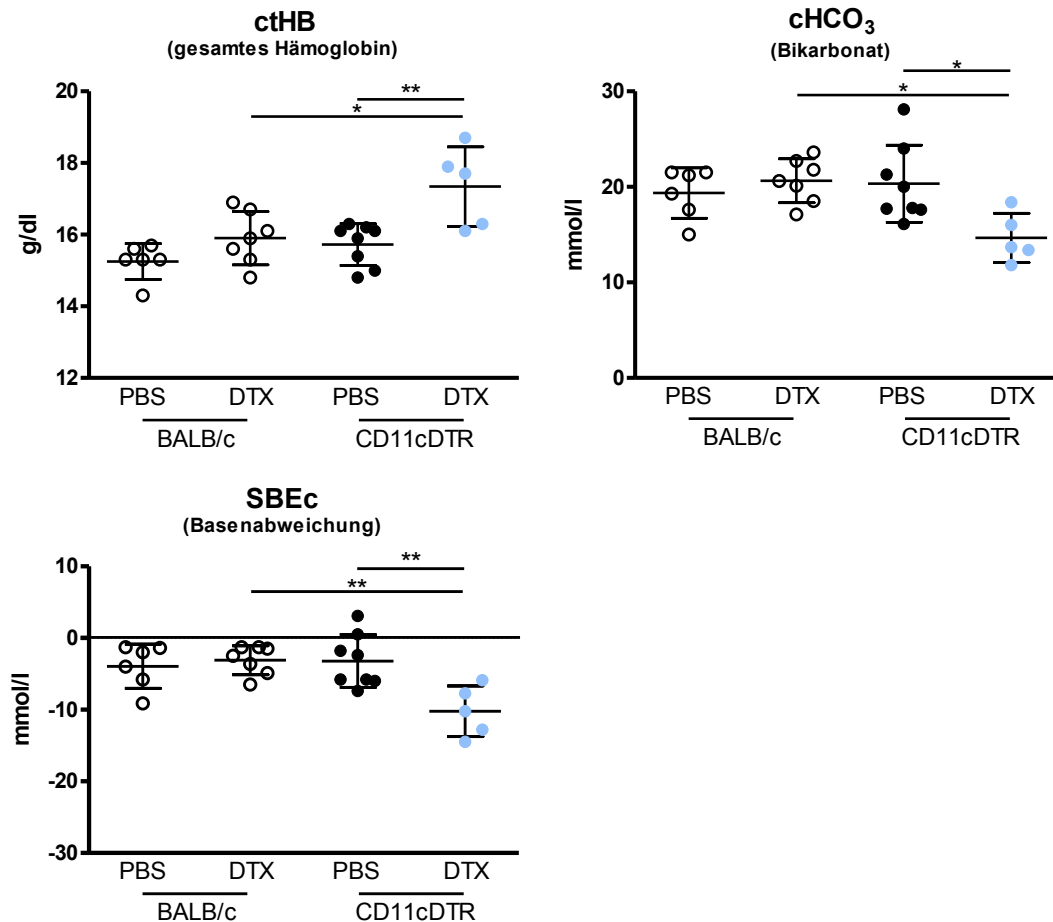


Abbildung 4-26: Blutgasanalyse nach Behandlung mit DTX

BALB/c Mäuse und CD11cDTR Mäuse wurden mit 100 ng DTX, Kontrolltiere wurden mit 100 µl PBS i.t. behandelt. Die Blutentnahme erfolgte an der *arteria carotis* 96 h nach der Depletion. Dabei kam es zu Änderungen des Gesamtwerts des im Blut enthaltenen Hämoglobins (oben links), wobei die Werte der CD11cDTR Mäuse nach DTX Behandlung (blaue Kreise) gegenüber den Kontrollgruppen (leere Kreise, schwarze Kreise) anstiegen. Sowohl die Werte für die Menge an Bikarbonat (oben rechts) als auch die der Basenabweichung (unten) nahmen hingegen in den CD11cDTR Tieren nach DTX Behandlung ab. (n = 5-8, $p \leq 0,05$; 1way ANOVA Bonferroni Test)

Die Sauerstoffsättigung des Blutes (Abb. 4-25, oben rechts) hingegen zeigte keine signifikanten Abweichungen der Versuchsgruppen untereinander, was die These, dass die hohe Mortalität in den DTX-behandelten CD11cDTR Tieren nicht durch eine Unterfunktion der Lungen zu erklären war, unterstützte. Jedoch weisen die Blutgasparameter auf einen massiven Metabolismus irgendwo im Organismus der DTX behandelten CD11cDTR Tiere hin.

4.9 Effekte der DTX Applikation auf den Herzmuskel

4.9.1 Histologische Analyse des Herzmuskels

Während der Lungenfunktionstests wurde zu Überwachung der Vitalwerte der Tiere neben der Körpertemperatur auch ein Elektrokardiogramm (EKG) gemessen. Beide Parameter wurden technisch bedingt nur beobachtet, nicht aufgenommen. Jedoch lieferte das EKG klare Hinweise darauf, dass die DTX Behandlung der CD11cDTR Tiere Auswirkungen auf die Herzfunktion dieser Tiere hatte. So fielen z.B. deutliche Kreislaufprobleme dieser Tiere auf, die bereits vor dem Einsetzen der Narkose deutlich kälter als entsprechende Kontrolltiere waren. Beim Beginn der Messung des EKGs zeigten sich Unregelmäßigkeiten im Rhythmus des EKGs, welches in einigen Fällen schon nach kurzer Zeit nicht mehr detektierbar war und den Tod der Tiere anzeigte. Die Abstände zwischen den einzelnen EKG Peaks wurden dabei immer länger, wobei die Peaks parallel immer flacher wurden. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde nachfolgend der Herzmuskel der behandelten Tiere histologisch untersucht.

Hierbei wurden die Herzen zunächst in PFA (4 %) fixiert und nach Einbettung in Paraffin 5 µm Schnitte am Mikrotom angefertigt.

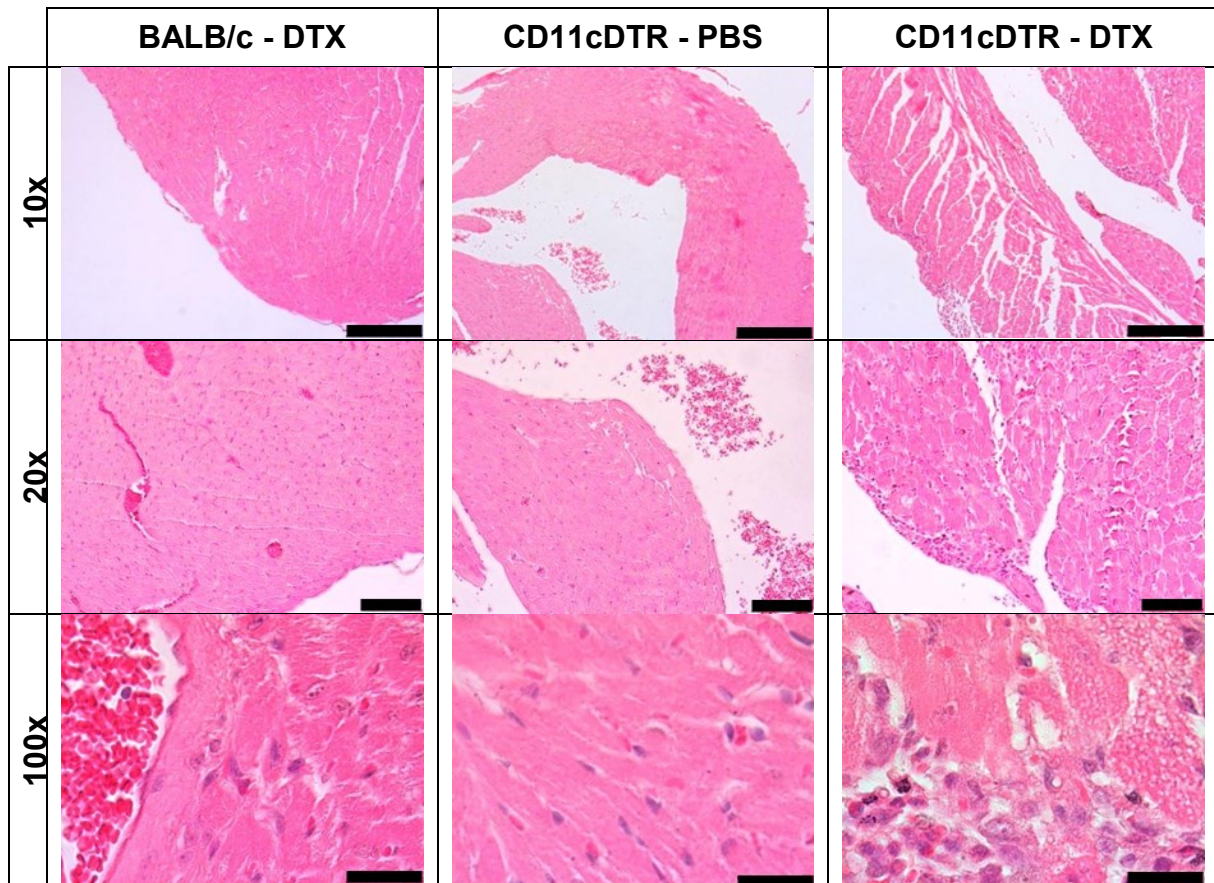


Abbildung 4-27: Histologische Präparate (H&E) des Herzmuskels nach Behandlung mit DTX

Für die histologische Untersuchung des Herzmuskels wurden BALB/c Mäuse (links) und CD11cDTR (rechts) Mäuse mit 100 ng DTX i.t. behandelt, sowie zur Kontrolle CD11cDTR Tiere mit 100 µl PBS i.t. behandelt (Mitte). In den unterschiedlichen Vergrößerungen zeigen sich strukturelle Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen und den CD11cDTR Tieren mit DTX Behandlung(repräsentative Beispiele). (Größenbalken von oben nach unten 250 µm, 100 µm, 25 µm)

Bereits in Übersichtsbildern (Abb. 4-27, obere Reihe) ließ sich erkennen, dass der Herzmuskel in den Kontrollgruppen der DTX-behandelten BALB/c Mäuse (linke Spalte) sowie der PBS-behandelten CD11cDTR Mäuse (mittlere Spalte) deutlich kompakter und von gleichmäßigerer Struktur war, als in den DTX-behandelten CD11cDTR Tieren (rechte Spalte). Bei stärkerer Vergrößerung konnte zusätzlich ein Anstieg der Anzahl infiltrierender Zellen in den CD11cDTR Mäusen nach DTX Behandlung beobachtet werden. Gekennzeichnet war dies durch die höhere Zahl an bläulich gefärbten Zellkernen. Bei hochauflösenden Aufnahmen konnten neben den infiltrierenden Zellen (Abb. 4-28, Pfeile) auch aufgeschwemmt wirkende, nekrotische Bereiche (Abb. 4-28, Pfeilköpfe) nach DTX Behandlung identifiziert werden.

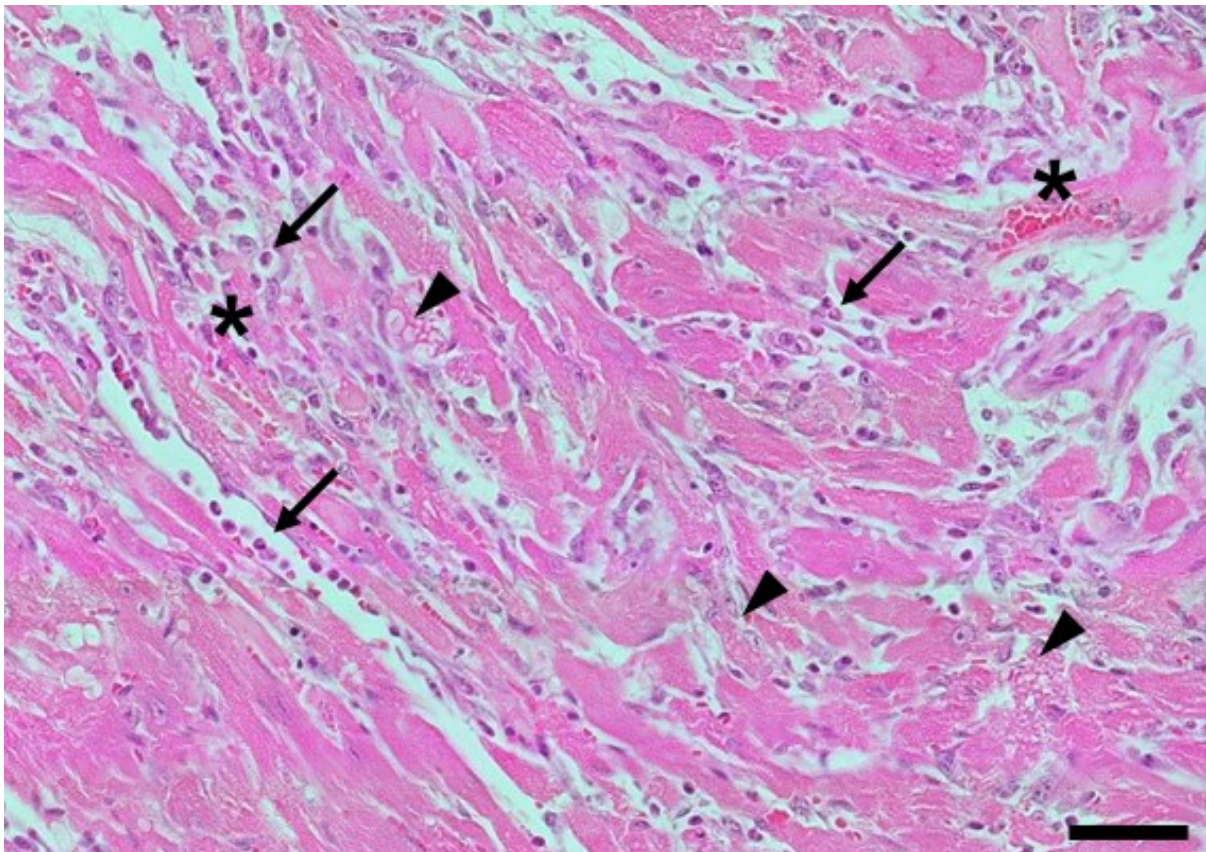


Abbildung 4-28: CD11cDTR Herzmuskel nach Behandlung mit DTX

Der histologische Schnitt eines Herzmuskels einer CD11cDTR Maus zeigt die Auswirkungen 96 h nach der Behandlung mit DTX. Neben infiltrierenden Zellen (Pfeile) ist das Gewebe teilweise geschädigt, nekrotische Bereiche (Pfeilköpfe) und Einblutungen in die Zellzwischenräume (Stern) sind deutlich erkennbar. (Größenbalken entspricht 50 μ m)

In einigen Bereichen kam es ebenfalls zu Hämorrhagien (Abb. 4-28, Stern) innerhalb des Muskelgewebes, erkennbar durch das ungeordnete Vorkommen von Erythrozyten in den entstandenen Zwischenräumen. Bei der Quantifizierung der Schädigung des Herzens anhand der Infiltrate und nekrotischen Bereiche (Abb. 4-29) zeigte sich deutlich, dass die Behandlung von transgenen Tieren mit DTX in allen Fällen zu einer Infiltration und Schädigung des Myokards führte. Die Behandlung der Kontrollgruppen hingegen hatte keinen Effekt auf die Herzmuskulatur.

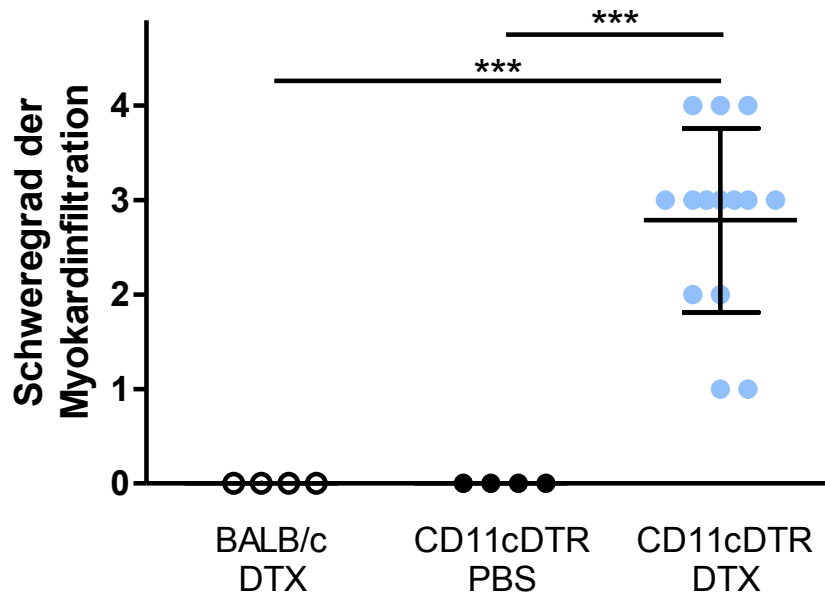


Abbildung 4-29: Schweregrad der Myokardinfiltration nach Behandlung mit DTX

Für die Analyse des Schweregrades der Myokardinfiltration wurden BALB/c Mäuse und CD11cDTR Mäuse mit 100 ng DTX i.t. behandelt, sowie zur Kontrolle CD11cDTR Tiere mit 100 µl PBS behandelt. Der Herzmuskel wurde 96 h nach der Behandlung entnommen, in Paraffin eingebettet und histologische Schnitte von 5 µm Stärke angefertigt. Die Einstufung des Schweregrades erfolgte anhand der Menge an infiltrierenden Zellen sowie des Auftretens nekrotischer Bereiche. (n = 4-14; $p \leq 0,001$; 1way ANOVA Bonferroni Test)

4.9.2 Analyse der infiltrierenden Zellen im Herzmuskel

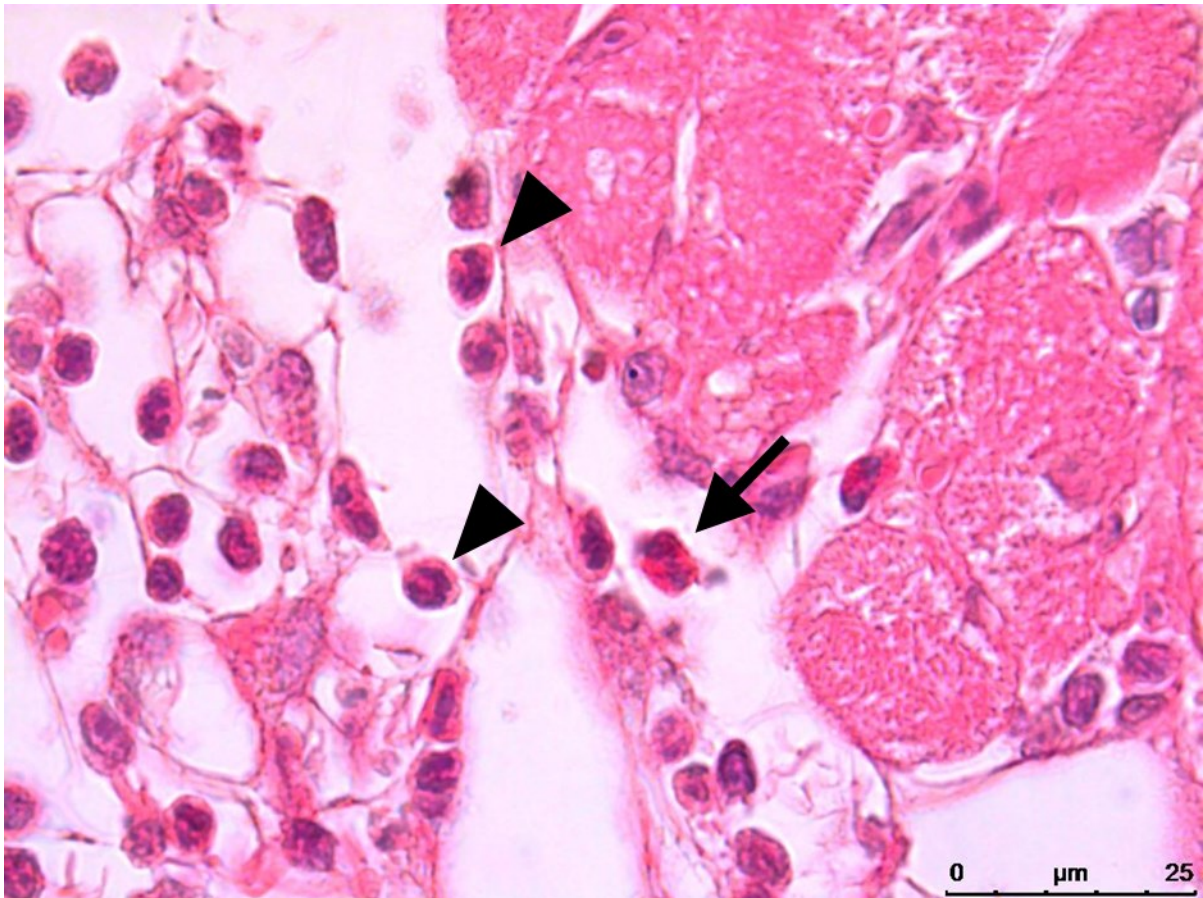


Abbildung 4-30: Infiltrierende Zellen im Herzmuskel nach Behandlung mit DTX

Der histologische Schnitt einer DTX-behandelten CD11cDTR Maus (nach 96 h) zeigt in der H&E Färbung überwiegend polymorphkernige Zellen (Pfeil und Pfeilköpfe), wobei es sich ausgehend von der Färbung der Granula um NΦ (Pfeilköpfe, rötliches Zytoplasma) und Eosinophile (Pfeil, stark rotes Zytoplasma) handelt.

Bei der hochauflösenden Analyse der histologischen Präparate wurde deutlich, dass ein Großteil der infiltrierenden Zellen einen mehrfachgelappten Zellkern aufwiesen und den NΦ zuzuordnen waren (Abb. 4-30; Pfeilköpfe). Auch Eosinophile Granulozyten (Abb. 4-30; Pfeil) ließen sich aufgrund ihrer roten Granula in den Gewebeschnitten identifizieren. Für eine genauere Identifizierung wurden die Herzen 48 h und 96 h nach DTX Behandlung entnommen und aus ihnen eine Einzelzellsuspension mittels enzymatischen Verdaus des Bindegewebes generiert, um diese durchflusszytometrisch zu analysieren. Dabei wurden Antikörper zur Identifizierung von Leukozyten allgemein (anti-CD45 Antikörper), T-Lymphozyten (anti-CD45 und anti-CD3ε Antikörper), NΦ (anti-CD45 und anti-Ly6G) sowie Eosinophilen Granulozyten (anti-CD11b, anti-SiglecF und anti-CD11c) verwendet.

Für die Auswertung wurden zunächst die aneinander haftenden Zellen (Doubletten) im FSC-Area/FSC-Hight Dotplot, sowie die Zelltrümmer im FSC/SSC Dotplot von der Quantifizierung ausgeschlossen.

Bereits nach 48 h (Abb. 4-31, links) konnte sowohl in der WT als auch in der transgenen Gruppe (beide mit DTX behandelt) ein Anstieg an CD45 positiven Zellen auf rund 5 % der lebenden Einzelzellen gemessen werden. Einen Großteil dieser Zellen machten mit 3 % in der transgenen Gruppe die NΦ aus. In der WT Gruppe hingegen lag die Anzahl der NΦ lediglich bei rund 1 %, wobei all diese Werte einer hohen Schwankung unterlagen, sodass die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant waren. Lediglich die Population an NΦ stieg in der transgenen Gruppe zwischen den PBS- und den DTX-behandelten Tieren signifikant an.

Nach 96 h (Abb. 4-31, rechts) veränderte sich die Zusammensetzung der infiltrierenden Populationen hingegen deutlich. Die hohen Werte an CD45 positiven Zellen lagen in den Kontrollgruppen (WT+DTX, TG+PBS) mit rund 2 % hinter den Werten von rund 6 % in der transgenen, AM depletierten Gruppe zurück. Auch hierbei bildeten wieder die NΦ mit rund 4 % den größten Anteil der CD45+ Gruppe. Aber auch die Zahl der Eosinophilen stieg von rund 0,02 % in den Kontrollgruppen auf durchschnittlich 0,17 % (Höchstwert 0,33 %) in der CD11cDTR DTX-behandelten Gruppe an. Dennoch waren die Werte der Ly6G+ bzw. CD45+ Populationen wieder hohen Schwankungen unterworfen, was sich aber mit den bereits beobachteten unterschiedlichen Schweregraden der Myokardinfiltration erklären ließ. Auch die Beurteilung des Schweregrades in den histologischen Schnitten zeigte bereits eine unterschiedlich starke Ausprägung der Infiltration des Herzmuskels.

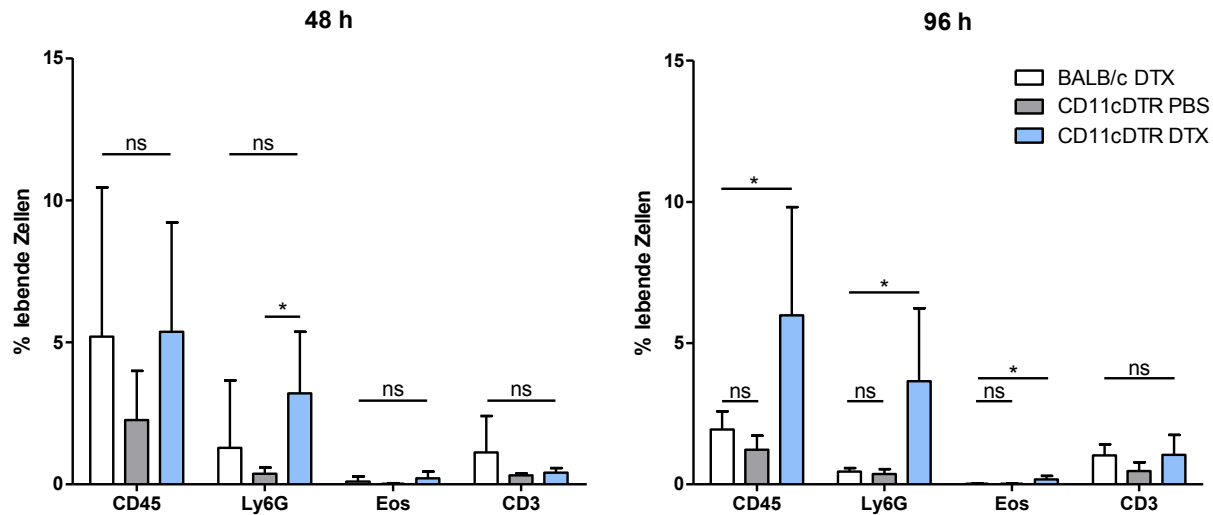


Abbildung 4-31: Infiltrierende Zellen im Herzmuskel nach Behandlung mit DTX

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden BALB/c Mäuse und CD11cDTR Mäuse mit 100 ng DTX i.t. behandelt, sowie zur Kontrolle CD11cDTR Tiere mit 100 µl PBS. Der Herzmuskel wurde 48 h bzw. 96 h nach der Depletion präpariert, in PBS/Liberase [0,2 mg/ml] 60 min inkubiert und schließlich in eine Einzelzellsuspension überführt. (n = 3; p ≤ 0,05; Students t-Test FDR korrigiert)

Zusätzlich stieg auch die Anzahl an CD3 positiven Zellen, sowie die Anzahl an Eosinophilen innerhalb von 96 h an, wobei die Unterschiede zu den Kontrollgruppen marginal waren.

4.9.3 Depletion von Makrophagen und Neutrophilen

Da bei der Analyse der infiltrierenden Zellen in den Herzmuskel auffiel, dass vorrangig NΦ zu finden waren, sollte in einem weiteren Ansatz geprüft werden, ob diese Zellen maßgeblich für den letalen Ausgang der Behandlung mit DTX verantwortlich waren. Hierfür wurden in zwei Ansätzen die NΦ parallel zur AM Depletion mit DTX ebenfalls depletiert. Dies erfolgte durch die i.p. Applikation der depletierenden Antikörper anti-Gr-1 (Klon RB6-8C5), sowie dem NΦ-spezifischen Antikörper anti-Ly6G (Klon 1A8).

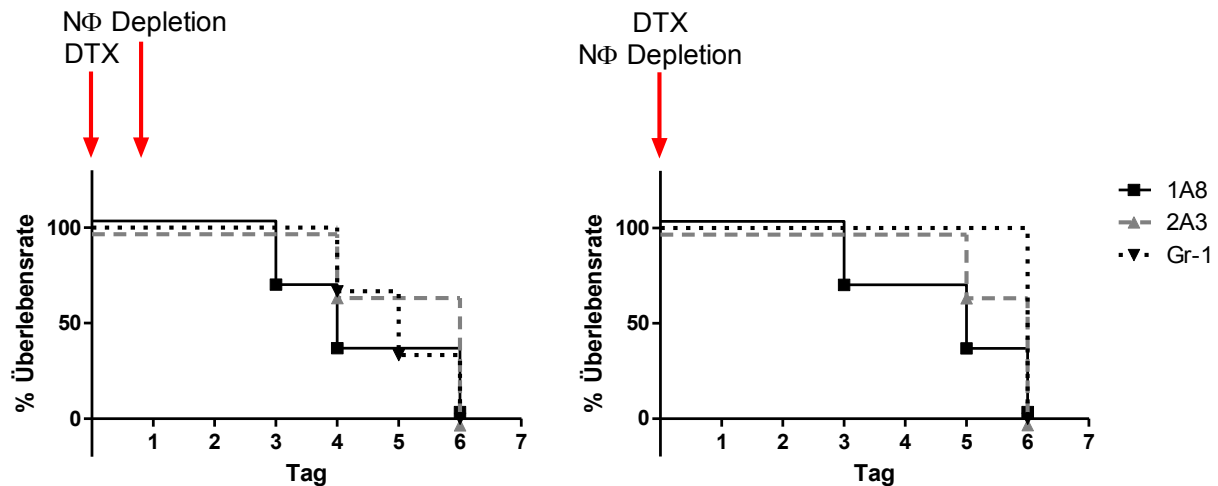


Abbildung 4-32: Überlebenskurve nach Depletion mit DTX sowie NΦ Depletion

Für die Bestimmung der Überlebenskurve wurden CD11cDTR Mäuse mit 100 ng DTX in 100 μ l i.t. vorbehandelt. Zusätzlich wurde den Tieren an Tag 1 nach der Makrophagendepletion (links), bzw. zum selben Zeitpunkt der Makrophagendepletion (rechts) der NΦ-depletierende Antikörper anti-Gr-1 [100 μ g] (Dreieck, schwarz gestrichelte Linie) bzw. anti-Ly6G [200 μ g] (Quadrat, schwarze Linie) sowie deren Isotypkontrolle 2A3 [200 μ g] (Dreieck, grau gestrichelte Linie) i.p. gespritzt. (n = 1; Log-rank Mantel-Cox Test)

Im ersten Versuch wurde den Tieren 24 h nach der AM Depletion (Abb. 4-32, links) zusätzlich entweder der depletierende Antikörper anti-Gr-1 oder anti-Ly6G, bzw. deren Isotypkontrolle i.p. gespritzt. Dennoch konnte keine Verbesserung der Überlebensrate innerhalb der NΦ-depletierten Gruppen gegenüber der Isotypkontrolle festgestellt werden. Auch eine Depletion zeitgleich mit der Makrophagendepletion (Abb. 4-32, rechts) brachte keine Verbesserung der Überlebensrate. Die Wiederholung dieses Versuches mit einer Depletion der Neutrophilen 5 h prior der DTX Applikation, zusätzlich zu einer zeitgleich behandelten Versuchsgruppe, zeigte ebenfalls kein erhöhtes Überleben der Tiere. Durchflusszytometrische Analysen bestätigten hingegen, dass die Neutrophilen sowohl bei vorangegangener Applikation von anti-Ly6G, sowie zeitgleich zur DTX Behandlung, im Blut nicht mehr nachweisbar waren.

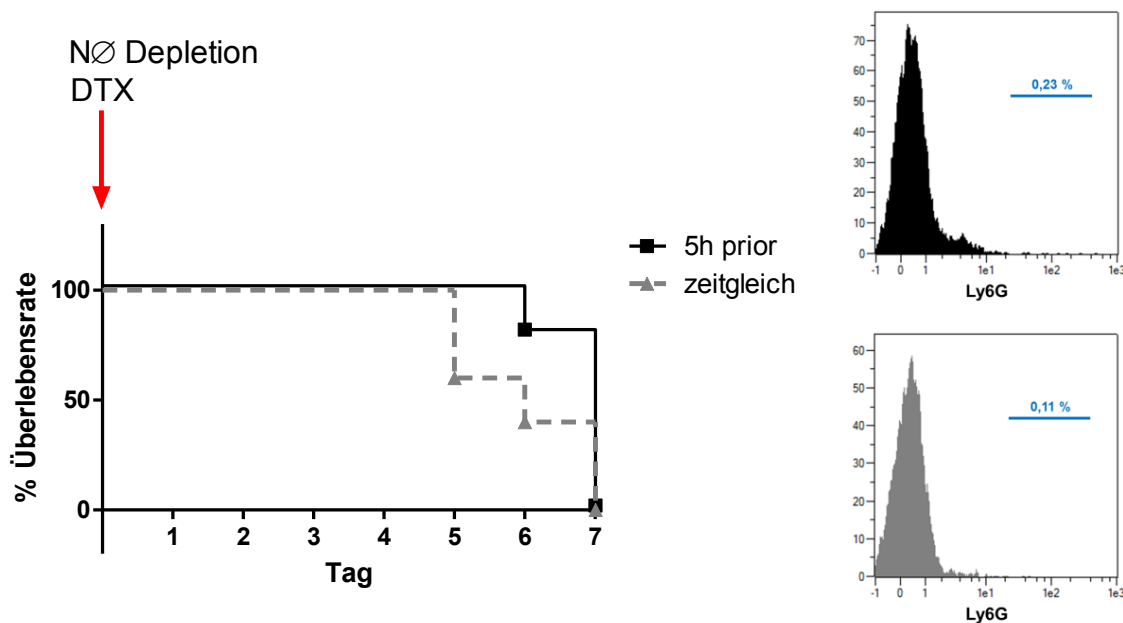


Abbildung 4-33: NΦ Depletion prior DTX Behandlung

Für die genauere Analyse des Einflusses von NΦ im CD11cDTR Modell wurden den Tieren 5 h vor der i.t. Behandlung mit DTX 200 µg des neutrophilen-spezifischen Antikörpers anti-Ly6G (Klon 1A8) i.p. appliziert (schwarzes Quadrat). Als Kontrolle diente die oben beschriebene zeitgleiche Applikation von DTX sowie anti-Ly6G (graues Dreieck). Die Analyse des Blutes im Durchflusszytometer ergab, dass sowohl bei zeitgleicher (unten, graues Histogramm), als auch vorangegangener Behandlung (oben, schwarzes Histogramm) mit anti-Ly6G die NΦ nach 5 h im Blut nicht mehr nachweisbar waren. Es konnten ebenfalls keine Unterschiede im Überleben beider Gruppen ermittelt werden. (n = 1; Log-rank Mantel-Cox Test)

4.9.4 Zelltod in CD11cDTR Mäusen

Um auszuschließen, dass die hohe Mortalität nach Applikation von DTX mit dem vermehrten Aufkommen toter Zellen zusammenhing, wurden in einem weiteren Ansatz Zellen, unabhängig von der DTX Applikation, lokal oder systemisch depletiert. Dabei wurden zum einen Alveolarmakrophagen in transgenen CD11cDTR Tieren durch die i.t. Behandlung mit Clodronat Liposomen eliminiert, zum anderen wurden NΦ in den transgenen Tieren durch die i.p. Injektion von 200 µg des NΦ-spezifischen Antikörpers anti-Ly6G (Klon 1A8) depletiert.

Die Überlebenskurven beider Ansätze (Abb. 4-34, links) zeigten, dass die CD11cDTR Tiere, trotz Zelldepletion und der damit einhergehenden, großen lokalen oder systemischen Anzahl an toten Zellen keine erhöhte Mortalität aufwiesen.

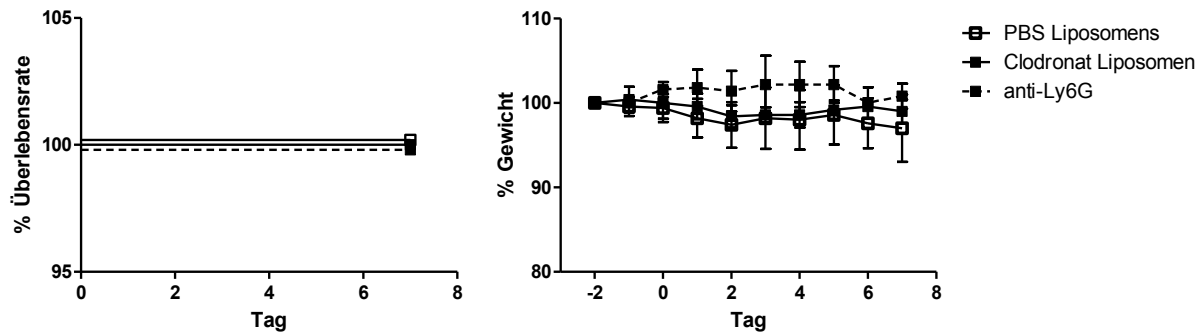


Abbildung 4-34: Überlebenskurve von CD11cDTR Tieren nach Depletion verschiedener Zellen

Hierfür wurden CD11cDTR Mäuse mit je 50 μ l Clodronat Liposomen (schwarzer Kreis) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen i.t. behandelt. Als Kontrolle diente hierbei die Applikation von PBS Liposomen (leerer Kreis) in CD11cDTR Mäuse, ebenfalls je 50 μ l an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Außerdem wurden CD11cDTR Mäuse mit dem N Φ -depletierenden Antikörper anti-Ly6G [200 μ g] (schwarzes Quadrat) i.p. behandelt und alle Gruppen für einen Zeitraum von bis zu 7 Tagen beobachtet. Dabei wurde neben der Überlebensrate (links), der Allgemeinzustand sowie der Gewichtsverlust (rechts) innerhalb des Beobachtungszeitraums protokolliert. (n = 1; Log-rank Mantel-Cox Test)

Die Betrachtung der Gewichtskurven (Abb. 4-34, rechts) zeigte zusätzlich nur einen minimalen Verlust des Gewichtes in den ersten 2 Tagen nach der Depletion. Die Tiere erholten sich innerhalb weniger Tage vom Behandlungsstress (Narkose, Depletion) wohingegen bei den bisherigen Versuchen zur DTX-vermittelten Depletion eine kontinuierliche Gewichtsreduktion in den CD11cDTR Mäusen zu beobachten war. Daraus ergab sich, dass die letale Wirkung nicht von einem massiven Zelltod abhängig war, sondern durch die Applikation des Diphtherietoxins in die transgene Linie CD11cDTR ausgelöst wurde.

4.9.5 Verteilung von CD45 positiven Zellen im Herzmuskel

Neben der Anzahl an CD45 positiven Zellen im Herzmuskel war ebenso die Verteilung dieser Zellen innerhalb des gesamten Herzmuskels wichtig. Hierfür wurden am Tag 4 nach der Depletion die Herzen perfundiert, entnommen und nach Verwendung eines chemischen Organ-*Clearing*-Prozesses (Methodenteil 3.5.5) im Lichtblatmikroskop analysiert.

Dabei ließ sich erkennen, dass die CD45 positiven Zellen (Abb. 4-35, oben, sowie Abb. 4-36/37) in den Kontrollgruppen gleichmäßig über den gesamten Muskel verteilt waren. In den transgenen Tieren nach DTX Behandlung kam es hingegen zu einem verstärkten Vorkommen von CD45+ Zellen im Übergangsbereich zwischen den Vorhöfen zur Herzkammer (Abb. 4-38), speziell um die Herzklappen herum und

entlang des Septums. Zusätzlich konnte am unteren Ende der His-Bündel, im Übergangsbereich der Tawara-Schenkel in die Purkinje-Fasern, eine weitere Akkumulation an CD45+ Zellen beobachtet werden (Abb. 4-35, gelbe Quadrate). All diese Bereiche sind zentral wichtig für die Reizweiterleitung im Herzen und damit für eine koordinierte Kontraktion der Muskelpartien.

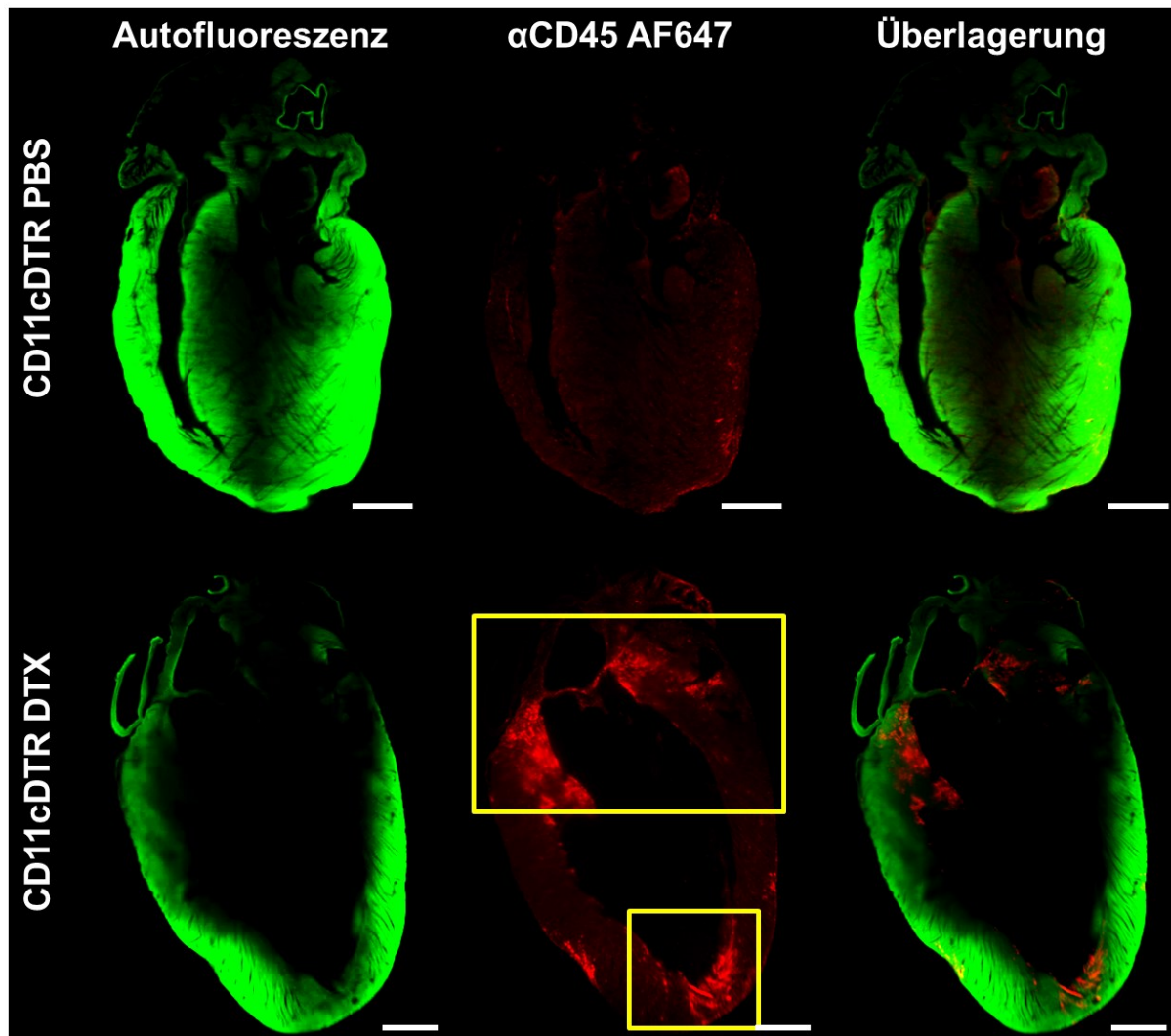


Abbildung 4-35: Verteilung von CD45 positiven Zellen im Herzmuskels nach Behandlung mit DTX – 2D

Für die Verteilungsanalyse der CD45 positiven Zellen im Herzmuskel wurden BALB/c und CD11cDTR Tieren 100 ng DTX in einem Volumen von 100 μ l i.t. appliziert, sowie CD11cDTR Tiere mit 100 μ l PBS i.t. vorbehandelt. Den Tieren wurde 96 h nach der Depletion ein anti-CD45 Antikörper retroorbital injiziert. Anschließend wurden die Tiere schmerzfrei getötet und der entnommene Herzmuskel im Lichtblattemikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm (linke Spalte, Autofluoreszenz, grün) sowie von 647 nm (mittlere Spalte, CD45 Kanal, rot) aufgenommen. (n = 1) (Größenbalken: oben 800 μ m, unten 1000 μ m)

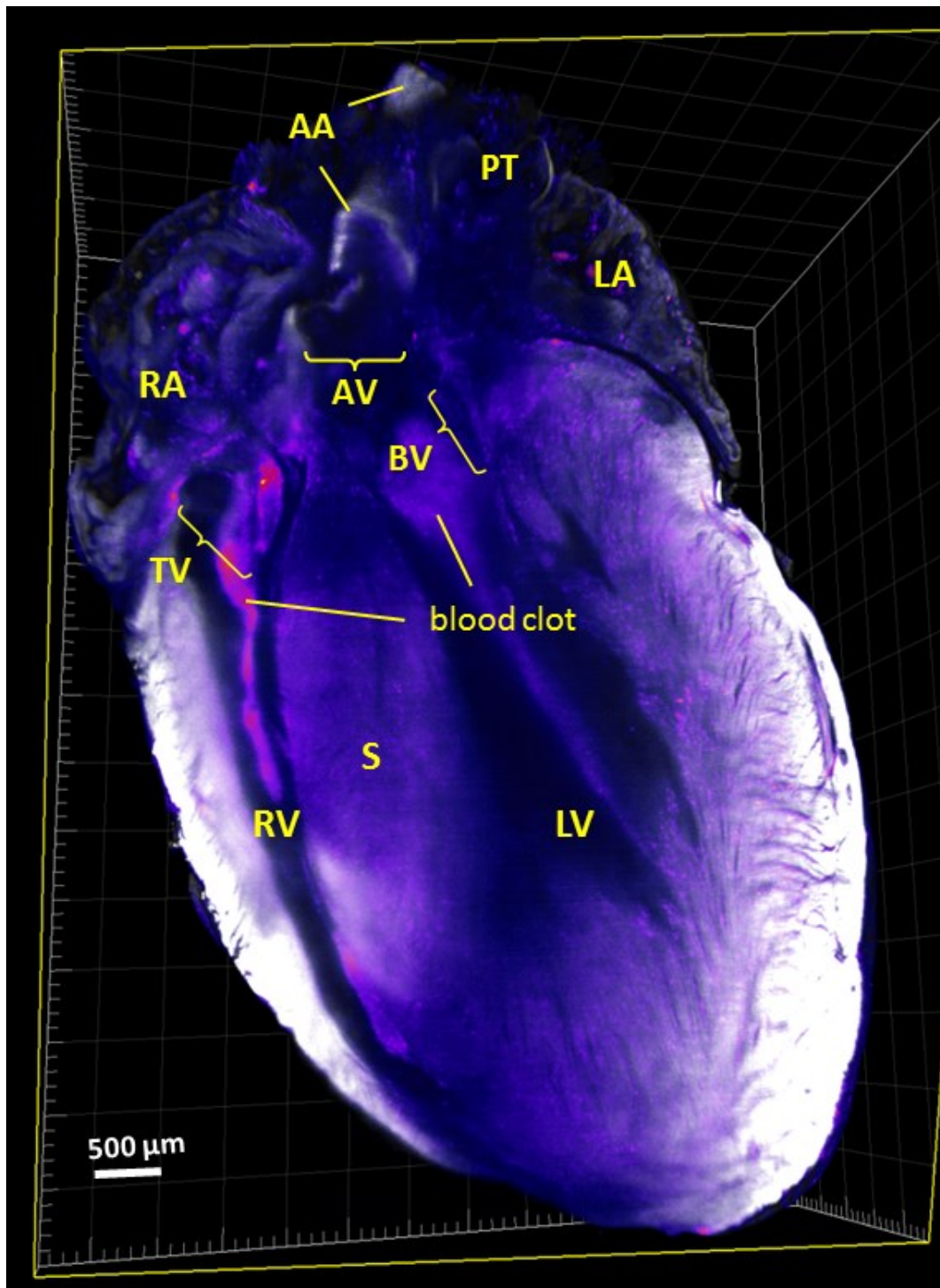


Abbildung 4-36: Verteilung von CD45 positiven Zellen im Herzmuskel nach Behandlung mit PBS – 3D Intensitätsverteilung

Dreidimensionale Darstellung (*Blend rendering*) mit Intensitätsverteilung (*heat map*) der CD45 positiven Zellen im Herz einer DTX-behandelten BALB/c Maus, 96 h nach Behandlung. Der gelbe Rahmen gibt die virtuelle Schnittfläche bei ventraler Draufsicht an, wobei relevante Strukturen gekennzeichnet sind. (weiß- Autofluoreszenz, Intensitätsskala – CD45 positive Zellen) RA – rechtes Atrium; LA – linkes Atrium; RV – rechter Ventrikel, LV – linker Ventrikel, S – interventrikuläres Septum; BV – Mitralklappe; TV – Trikuspidalklappe; AV – Aortenklappe, AA – Aortenbogen; PT – Lungenstamm)

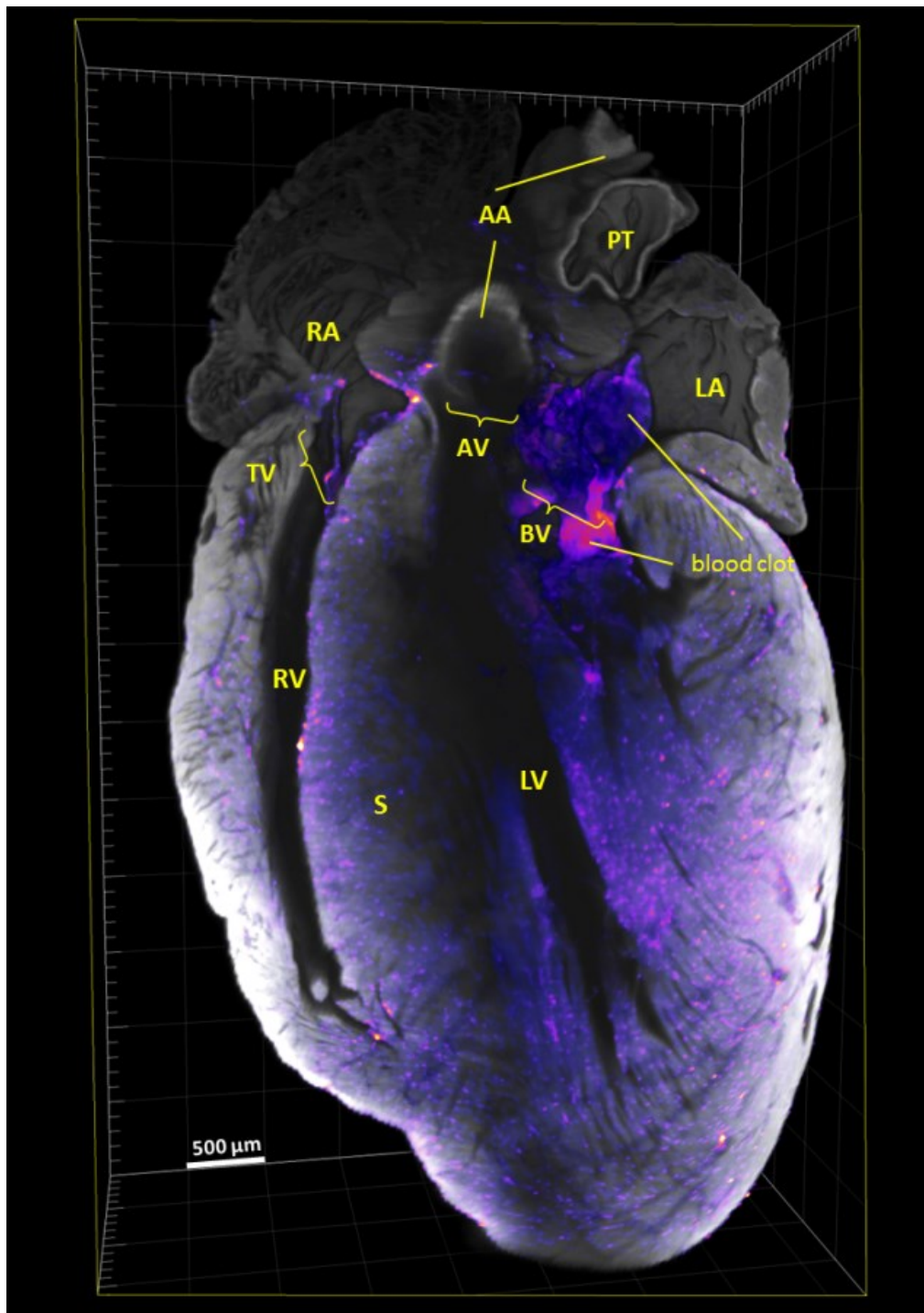


Abbildung 4-37: Verteilung von CD45 positiven Zellen im Herzmuskel nach Behandlung mit PBS – 3D Intensitätsverteilung

Dreidimensionale Darstellung (*Blend rendering*) mit Intensitätsverteilung (*heat map*) der CD45 positiven Zellen im Herz einer PBS-behandelten CD11cDTR Maus, 96 h nach Behandlung. Der gelbe Rahmen gibt die virtuelle Schnittfläche bei ventraler Draufsicht an, wobei relevante Strukturen gekennzeichnet sind. (weiß- Autofluoreszenz, Intensitätsskala – CD45 positive Zellen) RA – rechtes Atrium; LA – linkes Atrium; RV – rechter Ventrikel, LV – linker Ventrikel, S – interventrikuläres Septum; BV – Mitralklappe; TV – Trikuspidalklappe; AV – Aortenklappe, AA – Aortenbogen; PT – Lungenstamm)

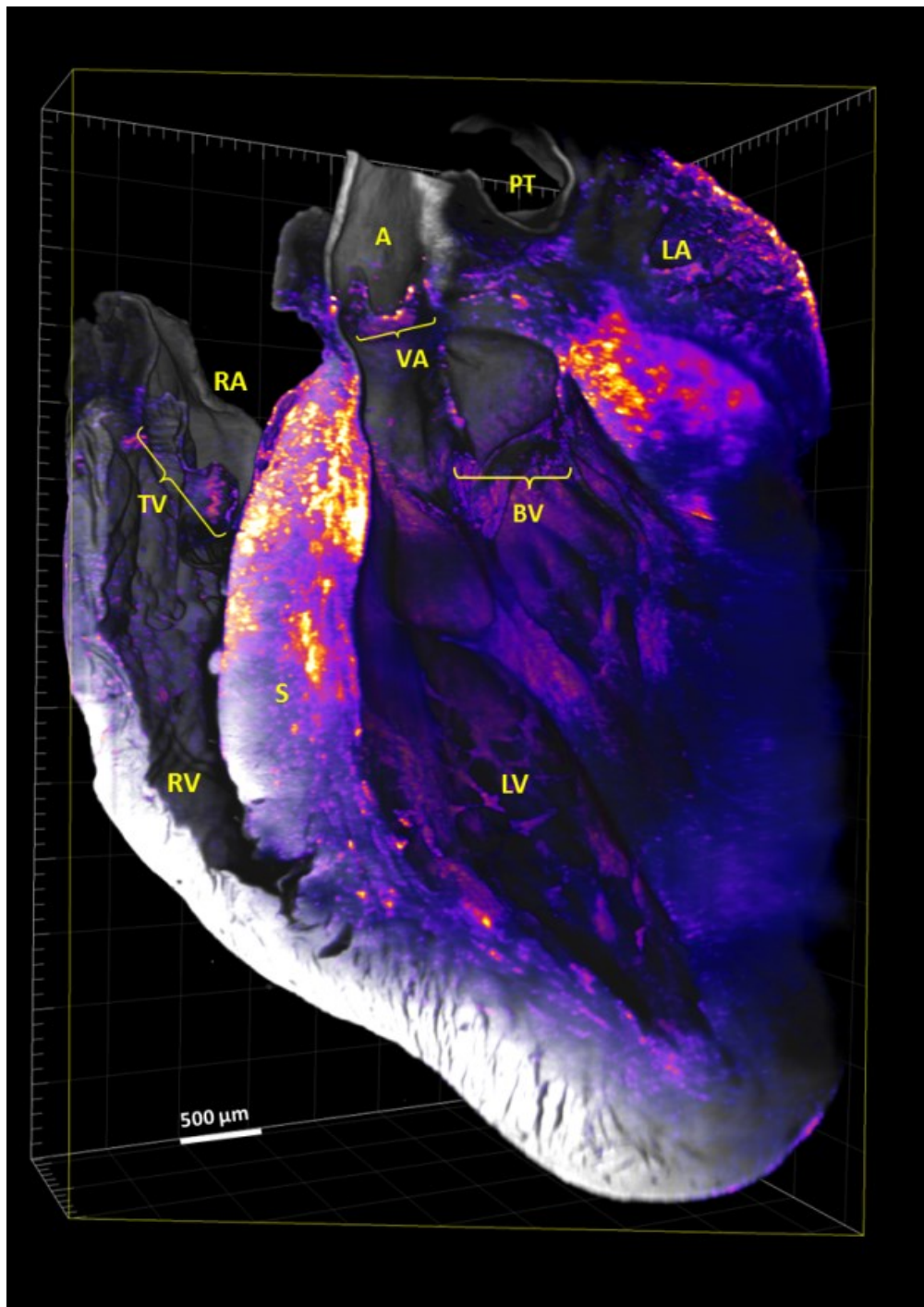


Abbildung 4-38: Verteilung von CD45 positiven Zellen im Herzmuskel nach Behandlung mit DTX – 3D Intensitätsverteilung

Dreidimensionale Darstellung (*Blend rendering*) mit Intensitätsverteilung (*heat map*) der CD45 positiven Zellen im Herz einer DTX-behandelten CD11cDTR Maus, 96 h nach Behandlung. Der gelbe Rahmen gibt die virtuelle Schnittfläche bei ventraler Draufsicht an, wobei relevante Strukturen gekennzeichnet sind. (weiß- Autofluoreszenz, Intensitätsskala – CD45 positive Zellen) RA – rechtes Atrium; LA – linkes Atrium; RV – rechter Ventrikel, LV – linker Ventrikel, S – interventrikuläres Septum; BV – Mitralklappe; TV – Trikuspidalklappe; AV – Aortenklappe, AA – Aortenbogen; PT – Lungenstamm)

4.9.6 Elektrokardiogramme nach Depletion mit DTX

Ausgehend von den Auffälligkeiten an den reizweiterleitenden Bereichen des Herzmuskels wurden in einem weiteren Versuch die Elektrokardiogramme (EKG) von BALB/c (WT) Tieren und CD11cDTR (TG) Tieren aufgenommen, die zuvor mit PBS oder DTX behandelt worden waren. Die Messungen erfolgten 96 h nach der i.t. Vorbehandlung.

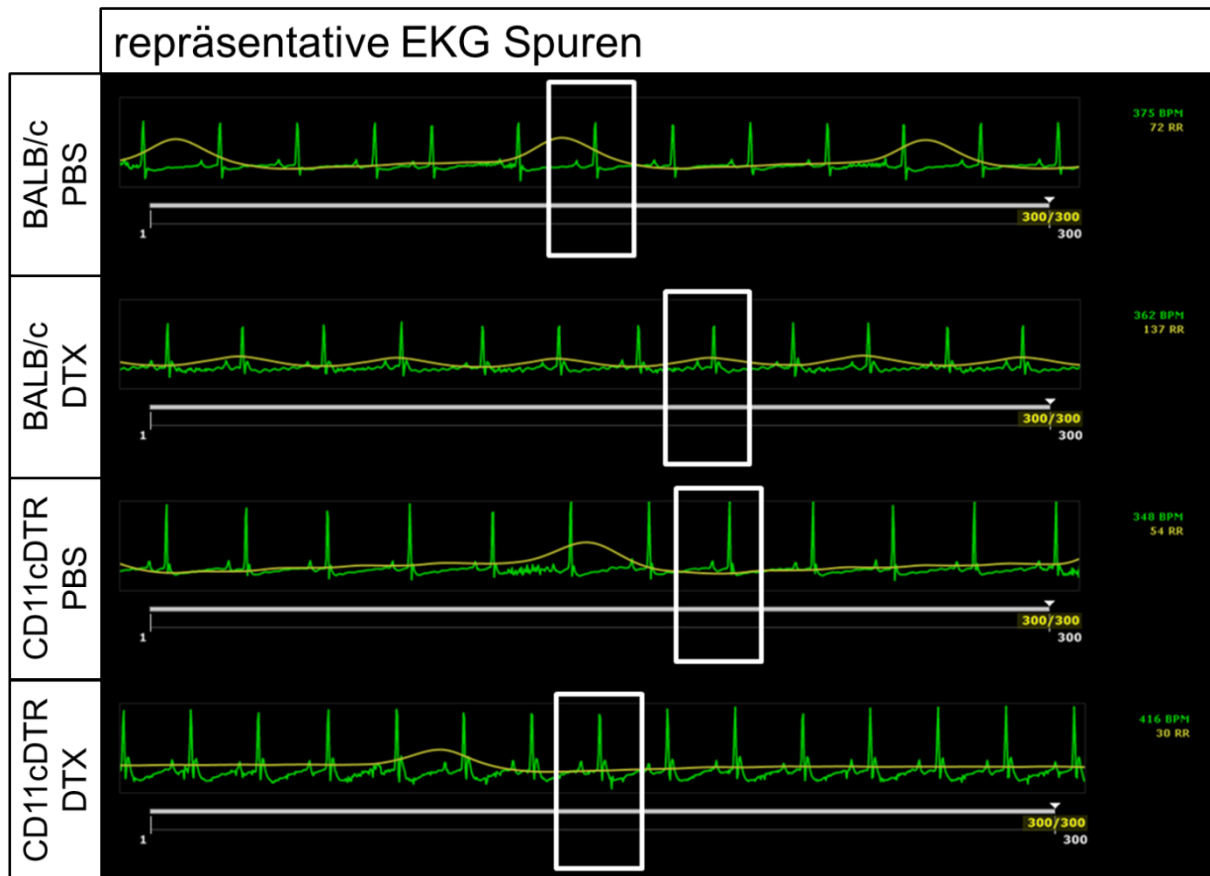


Abbildung 4-39: Repräsentative EKG Aufnahmen *in vivo* nach Behandlung mit DTX

BALB/c Tiere (WT) sowie CD11cDTR Tiere (TG) wurden mit PBS oder DTX i.t. behandelt. Die Messung der EKGs (grüne Linie) erfolgte 96 h nach Behandlung unter Narkose, wobei zusätzlich die Atemfrequenz (gelbe Linie) der Tiere aufgezeichnet wurde. (Repräsentative Spuren für n=3-5 Tiere)

In den repräsentativen Beispielen (Abb. 4-39) der Elektrokardiogramme nach i.t. Behandlung ließen sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen erkennen. So zeigte die WT Gruppe nach PBS Behandlung einen normalen Verlauf des EKGs wohingegen die Kurven der transgenen Mäuse nach DTX Behandlung (Abb. 4-39, unten) deutliche Veränderungen in einzelnen Abschnitten des EKGs aufwiesen. Nach Vergrößerung der gekennzeichneten Bereiche (Abb. 4-39, weiße Rechtecke) ließen sich die einzelnen Phasen deutlich erkennen.

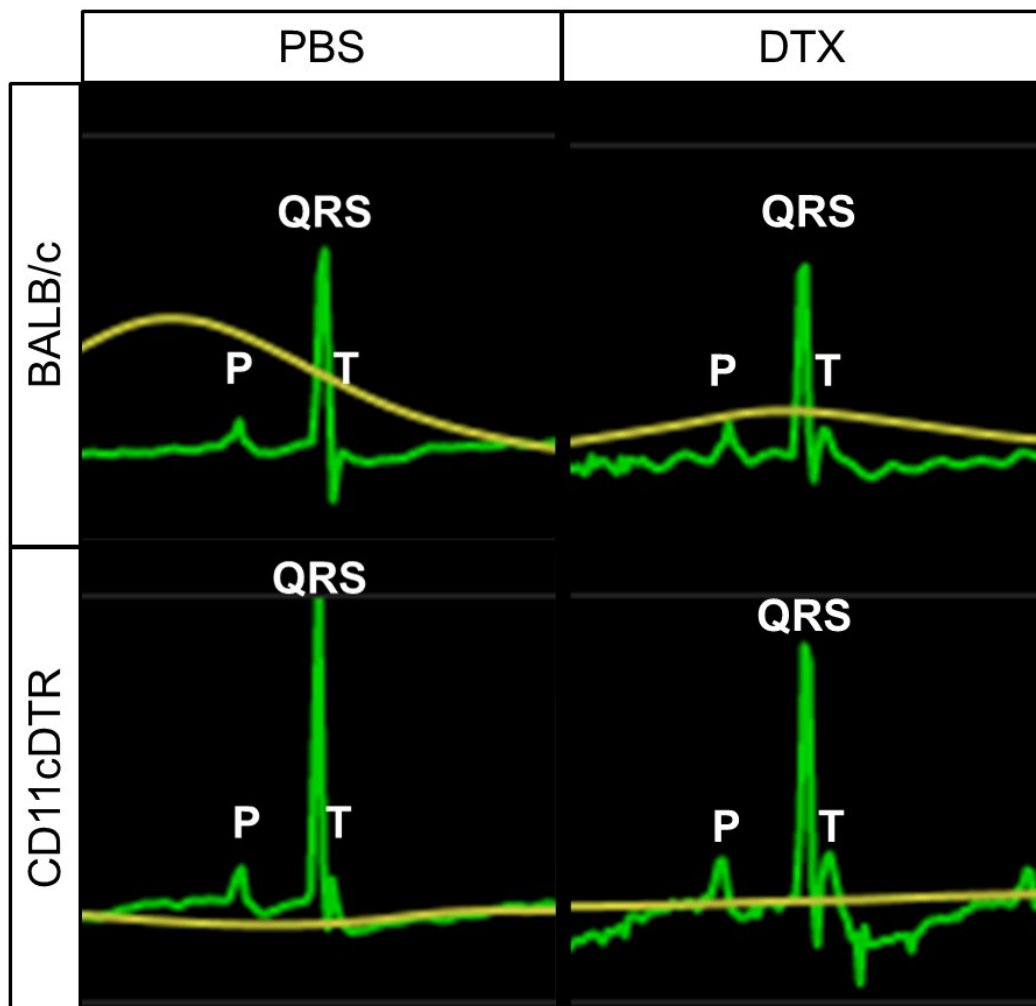


Abbildung 4-40: Auszug der EKGs nach Depletion mit DTX

BALB/c (WT) Tiere sowie CD11cDTR (TG) Tiere wurden mit PBS oder DTX i.t. behandelt. Die Messung der EKGs (grüne Linie) erfolgte 96 h nach Behandlung unter Narkose, wobei zusätzlich die Atemfrequenz (gelbe Linie) der Tiere aufgezeichnet wurde. Dabei ließen sich die einzelnen Phasen der Erregungsleitung erkennen: P kennzeichnet die P-Welle (Vorhoferregung), QRS beschreibt die Erregungsausbreitung in den Herzkammern, T bezeichnet die T-Welle, also die Repolarisation der Ventrikel.

In Abbildung 4-40 wurden die einzelnen Phasen der EKGs detaillierter dargestellt. Die Vergrößerung oben rechts zeigt dabei das EKG einer WT Maus nach PBS Behandlung, wobei die einzelnen Abschnitte P (P-Welle; Vorhoferregung), QRS (QRS-Komplex; Erregungsausbreitung in der Herzkammer) und T (T-Welle, Repolarisation der Ventrikel) denen einer gesunden Maus entsprachen. Nach der Behandlung von WT Mäusen mit DTX (Abb. 4-40, oben rechts) fielen bereits leichte Änderungen beim Einsetzen der T-Welle auf. Diese zeigte einen höheren Peak als die T-Wellen vergleichbarer PBS-behandelter Tiere. Zusätzlich verlief die Basallinie weniger ruhig als in den PBS-behandelten BALB/c Tieren, ein Effekt der allerdings durch Muskelkontraktionen hervorgerufen werden kann. Auch bei den transgenen Tieren fiel die T-Welle bereits nach PBS Behandlung (Abb. 40, unten links) leicht

erhöht aus, wobei diese Erscheinung nach DTX Behandlung (Abb. 40, unten rechts) noch deutlicher wurde. Zusätzlich sank die Kurve nach der T-Welle ins Negative bevor sie nach längerer Zeit wieder das Basallevel (nicht gezeigt, gedachte Horizontale an der Basis der P-Welle) erreichte. Diese Verzögerung im Bereich der Repolarisation der Ventrikel sprach für eine massive Störung der Reizweiterleitung in Herzen der CD11cDTR Tiere nach DTX Behandlung.

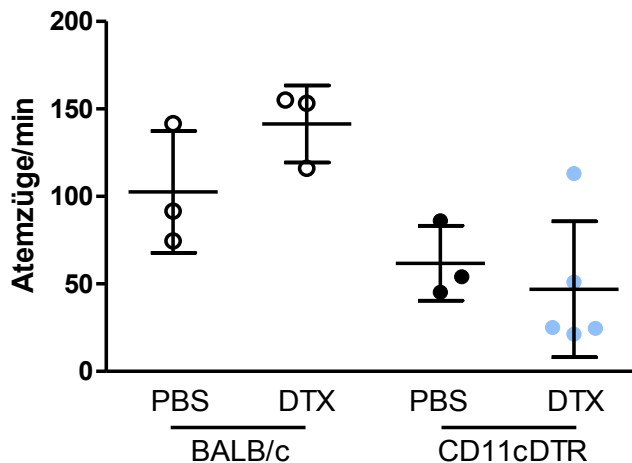


Abbildung 4-41: Atemfrequenz *in vivo* nach Depletion mit DTX

Die Atemfrequenz wurde 96 h nach der Depletion mit PBS (Kontrolle) bzw. DTX in CD11cDTR (ausgefüllte Kreise) sowie BALB/c Tieren (offene Kreise) ermittelt. (n=1; 1way ANOVA Bonferroni Test)

Neben den Auffälligkeiten im EKG konnte für die ebenfalls gemessene Atemfrequenz ein Abfall innerhalb der CD11cDTR DTX Gruppe festgestellt werden (Abb. 4-41). Dabei waren die Werte innerhalb der CD11cDTR Gruppe nach DTX Behandlung allerdings breit gestreut, sodass es zu keiner signifikanten Abnahme der Atemfrequenz kam. Dennoch fiel auf, dass ein großer Teil dieser Tiere (4 von 5) mit einer Atemfrequenz von 50 Atemzügen pro Minute und weniger deutlich unter den Frequenzen von BALB/c Tieren (Durchschnittlich 100 Atemzüge pro Minute) lagen.

5. Diskussion

Im Jahr 2009 wurde in der Arbeitsgruppe Gunzer die Frage nach der Rolle des Alveolarmakrophagen bei einer pulmonalen, invasiven *A. fumigatus* Infektion gestellt. Zu diesem Zeitpunkt wurde in der relevanten Fachliteratur wiederkehrend die zentrale Rolle dieser Zellsorte bei der Beseitigung der eingeatmeten Pilzsporen betont (Bhatia *et al.*, 2011; Dubourdeau *et al.*, 2006; Hasenberg *et al.*, 2011; Hohl *et al.*, 2005; Latge, 1999; Philippe *et al.*, 2003; Schaffner *et al.*, 1983; Waldorf *et al.*, 1984). *In vitro* und *in vivo* Mikroskopiestudien der AG Gunzer zeigten allerdings, dass es sich bei AM um eher träge Zellen bezüglich der Bewegungsgeschwindigkeit und der Phagozytoserate handelt (Behnsen *et al.*, 2007). Somit wurde die These formuliert, dass es sich bei dem AM ggf. eher um eine Sensorzelle handelt, welche hauptsächlich die Aufgabe übernimmt, das Auftreten pathogener Strukturen zu detektieren und anschließend weitere Effektorzellen, wie z.B. NΦ zum Ort der Detektion zu rekrutieren, welche primär die Eliminierung des Pilzes übernehmen. Diese These wird bis heute in zunehmendem Maße auch durch andere Studien unterstützt, die ebenfalls diese zentrale Rolle des AM bei einer *A. fumigatus* Infektion anzweifeln (Lehnert *et al.*, 2015; Mircescu *et al.*, 2009; Pollmacher & Figge, 2015).

Mircescu *et al.* verwendeten das Clodronat Liposomen Modell (Van Rooijen, 1989) um die alveolarständigen Makrophagen durch eine i.t. Applikation der Liposomen zu depletieren und konnten zeigen, dass dies keinen Einfluss auf die Überlebensrate von *A. fumigatus* infizierten Tieren hatte. In der Diplomarbeit von Linda Männ (AG Gunzer, Magdeburg, 2010) wurde dieser Befund reproduziert und mit einem weiteren Modell zur Depletion von AM verglichen. Die CD11cDTR Maus (Jung *et al.*, 2002) exprimiert den für Diphtherietoxin hoch affinen Primaten-Diphtherietoxinrezeptor unter Kontrolle des CD11c-Promotors, welcher auch in Makrophagenpopulationen, inklusive AM, aktiv ist. Eine i.t. Behandlung dieser Mäuse mit DTX ergab daher eine ähnlich starke Reduktion der AM Zahlen in der Lunge, verglichen mit dem Clodronatmodell. Nichtsdestotrotz führte eine Pilzinfektion dieser Tiere zu einer 100% Letalität, während die Clodronatgruppe eine 100% Überlebensrate aufwies. In Männns Diplomarbeit konnte zu diesem Resultat bereits gezeigt werden, dass die Rekrutierung von NΦ in beiden AM Depletionsmodellen der gleichen Kinetik unterlag. Die Bachelorarbeit von Jill Dalimot (AG Gunzer, Essen, 2013) konnte darüber hinaus

belegen, dass auch der Abbau der Pilzlast vergleichbar schnell und effektiv in beiden AM Depletionsmodellen verlief.

5.1 Immunreaktion nach DTX Behandlung und Infektion

Die vorliegende Dissertation sollte an diesem Punkt anknüpfen und primär die induzierten Immunreaktionen in der infizierten, DTX-behandelten Lunge einer CD11cDTR Maus charakterisieren. Grundlage für diesen Ansatz war die Überlegung, dass die transgenen Tiere ggf. durch eine unkontrolliert ablaufende, überschießende Immunreaktion, induziert durch die DTX Applikation, versterben könnten. Von NΦ ist beispielsweise bekannt, dass sie durch Ausschüttung von unspezifisch wirkenden Granulaenzymen umliegendes Gewebe direkt schädigen können (Kruger *et al.*, 2015; Mayadas *et al.*, 2014; Merza *et al.*, 2015; Neumann *et al.*, 2015; Sahoo *et al.*, 2014).

Im Verlauf dieser Arbeit konnte tatsächlich gezeigt werden, dass bereits die sterile Rekrutierung von NΦ in die Lunge von CD11cDTR Mäusen nach DTX Behandlung letal wirkte. Dabei konnten allerdings keine erhöhten Mengen an reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in den Lungen festgestellt werden, die auf eine vermutete Überfunktion der NΦ hindeuten würden. Auch während einer Infektion mit *Aspergillus fumigatus* zeigten die DTX-behandelten transgenen Tiere keine erhöhte Produktion von ROS. Eine erhöhte Aktivität der NΦ konnte demnach nicht nachgewiesen werden, wobei hier alternative Messungen weiterer Aktivitätsmarker für NΦ, wie beispielsweise die Ausschüttung der in den Granula enthaltenen Enzyme Myeloperoxidase (MPO) oder Neutrophilenelastase, zur weiteren Bestätigung hinzugezogen werden könnten. Hierfür wären sowohl *in vitro* Analysen der Gesamtmenge an Protein in der Lunge oder BAL über ELISA oder *in vivo* Analysen (zumindest für MPO beschrieben, (Gross *et al.*, 2009)) möglich.

Neben der spezifischen Aktivitätsbestimmung der NΦ wurde auch eine generelle Aktivierung des Immunsystems in der Lunge über die Quantifizierung von pro- und anti-inflammatorischen Proteinen charakterisiert. Dabei wurden für die pro-inflammatorischen Zytokine IL-2, IL-17A und IFN γ keine Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen und den AM depletierten Gruppen, mit und ohne *Aspergillus* Infektion, gefunden. Auch die anti-inflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 wiesen keine erkennbare Regulation auf. Da bei der Probengewinnung mittels BAL

die gesamte Lunge mit einem Milliliter Puffer gespült wurde, ist es hier möglich, dass das gewählte Volumen eine zu große Verdünnung erzeugte, um etwaige kleinere Proteinmengen bestimmen zu können. Alternativ hierzu könnten die Proteinlevel pro- und anti-inflammatorischer Proteine in der gesamten Lunge über eine homogenisierte Lungenprobe ermittelt werden. Parallel hierzu wäre auch eine quantitative Messung entsprechender mRNAs über quantitative PCR möglich, welche im Generellen als hochsensitives Verfahren gilt.

Für die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF α konnten hingegen Änderungen im Proteinlevel gemessen werden. Dabei stieg die Menge an TNF α in PBS-behandelten, infizierten Kontrolltieren an, wohingegen sie in den vergleichbaren, zuvor DTX-behandelten und damit AM-defizienten Tieren gering blieb. Auch die über Clodronat Liposomen depletierten Gruppen zeigten nach einer Infektion mit *A. fumigatus* keine Hochregulation von TNF α , was die in der Literatur beschriebene Funktion der Makrophagen als TNF α sekretierende Zellen bestätigte (Brown *et al.*, 2003). Alveolarmakrophagen scheinen demnach in der Lunge allein verantwortlich für die Sekretion von TNF α .

Auch für das Interleukin-6 kam es zu deutlichen Änderungen im Syntheseelevel, wobei hier die Besonderheit in der DTX-behandelten, uninfizierten Versuchsgruppe lag. Neben der allgemein erhöhten Produktion von IL-6 unter allen Infektionsbedingungen zeigte auch die DTX-behandelte, transgene Gruppe einen deutlichen Anstieg der IL-6 Konzentration. Dies war ein Indiz für eine induzierte allgemeine Immunreaktion unabhängig von einem Infektionsprozess. IL-6 wurde unter anderem beschrieben als Aktivator für die sogenannten Akute-Phase-Proteine (Bode *et al.*, 2012; Castell *et al.*, 1989). Diese Proteine, wie beispielsweise das C-reaktive Protein, dienen der Unterstützung der Immunabwehr, indem sie unter anderem die Funktion von Antikörpern nachahmen oder die Regulation der Körpertemperatur beeinflussen (Murphy, 2012). Dabei wurde das c-reaktive Protein bereits mehrfach im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen benannt und dient heute als Indikator für die Anfälligkeit gegenüber Myokardinfarkten und Schlaganfällen (Lagrand *et al.*, 1999; Ridker, 2001). Eine Bestimmung des Levels an c-reaktivem Protein im Serum könnte klären, ob die CD11cDTR Tiere grundsätzlich einem erhöhten Risiko ausgesetzt sind und/oder ob die Behandlung mit DTX die Ausschüttung dieses Akute-Phase-Proteins einleitet.

5.2 Einfluss von eosinophilen Granulozyten auf die Überlebensrate DTX-behandelter CD11cDTR Tiere

Unabhängig von der Aktivität der NΦ oder dem Immunsystem allgemein, konnte im Zuge dieser Arbeit eine fehlende Population an eosinophilen Granulozyten in DTX-behandelten, transgenen Tieren nach Infektion beschrieben werden. Diese Zellen erschienen erst bei Infektion mit *Aspergillus* und konnten in allen PBS-behandelten und infizierten Kontrollgruppen, sowie der Clodronat-behandelten, infizierten Gruppe nachgewiesen werden.

Eosinophile wurden, neben ihrer zentralen Rolle bei der Parasitenabwehr, auch im Zusammenhang mit chronischen Erkrankungen wie einer Kolitis charakterisiert (Kouro & Takatsu, 2009; Le Moine *et al.*, 1999; Masterson *et al.*, 2014; O'Byrne *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2011), in denen sie für die lokale Regulation der Neutrophileninflammation durch Ausschüttung anti-inflammatorischer Lipidmediatoren, wie z.B. Protectin D1, verantwortlich sind (Yamada *et al.*, 2011). In eosinophilendefizienten Mäusen wurden dabei erhöhte Werte pro-inflammatorischer Zytokine sowie ein vermehrtes Auftreten von NΦ festgestellt, die mit einer Verschlechterung der experimentellen Kolitis einhergingen (Masterson *et al.*, 2014). Auch bei Betrachtung pulmonaler Erkrankungen spielten Eosinophile eine Rolle. In Versuchen zu chronischen, pulmonalen *Aspergillus* Infektionen wurden Eosinophile als die dominant vorliegende Zellart in der Lunge beschrieben (Lilly *et al.*, 2012). Das Auftreten von Eosinophilen im Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen ist demnach auch mit einem regulatorischen Eingreifen dieser Zellen assoziiert. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass nach DTX Behandlung von CD11cDTR und anschließender Infektion keine Eosinophilen, wie in den Kontrollgruppen ohne Vorbehandlung oder nach Clodronat Applikation, auftraten, sollte der Einfluss dieser Zellen genauer betrachtet werden.

In erster Linie wurde dabei versucht, das Einwandern von Eosinophilen im Clodronatmodell nach Infektion mittels anti-IL5 AK Behandlung zu blockieren, um eine erhöhte Suszeptibilität wie im DTX Modell hervorzurufen (Kouro & Takatsu, 2009; Le Moine *et al.*, 1999; Leckie *et al.*, 2000; Ochkur *et al.*, 2007; Takatsu & Nakajima, 2008). Dabei wurde ein Fehlen dieser Zellen während einer akuten, pulmonalen Infektion mit *Aspergillus* bisher mit keiner letalen Wirkung assoziiert (Lilly

et al., 2014). Auch hier konnte keine erhöhte Mortalität nach anti-IL5 Behandlung im infizierten Clodronatmodell festgestellt werden.

Alternativ könnte die inverse Herangehensweise, bei der über die Rekrutierung von Eosinophilen durch Eotaxin-2 (Ben-Yehuda *et al.*, 2008; Conroy & Williams, 2001; Ochkur *et al.*, 2007; Sturm *et al.*, 2013) im DTX-Modell eine ähnliche Überlebensrate wie im Clodronatmodell erreicht werden soll, genaueren Aufschluss über die Funktion der Eosinophilen geben. Vorexperimente hierzu konnten bereits belegen, dass die Rekrutierung von Eosinophilen über Eotaxin-2 möglich ist. Aufgrund der in dieser Arbeit untersuchten weiteren Aspekte wie Lungenfunktion und Myokarditis, wird jedoch von einer eher untergeordneten Rolle der Eosinophilen ausgegangen, da sich die Lungenfunktion in den DTX-behandelten Tieren nicht essentiell verschlechterte.

5.3 Letale Wirkung bei einmaliger DTX Behandlung

Durch spontan auftretende Unregelmäßigkeiten in den Versuchsergebnissen bezüglich der Überlebensrate nach DTX Applikation wurden verschiedene DTX Chargen auf ihr Depletionspotential hin getestet werden. Aus diesen Kontrollversuchen resultierte die unerwartete Beobachtung, dass bereits die einmalige i.t. Applikation von DTX in Lungen transgener CD11cDTR Mäuse, innerhalb von 5 Tagen zu der erhöhten Mortalitätsrate führte. Dabei wurde die hohe Sterblichkeit schon ab einer Konzentration von 50 ng DTX pro Tier (dies entsprach einer Dosis von 2,5 ng/g Körpergewicht) erreicht, wohingegen in der ursprünglichen Publikation zu dieser Mauslinie mit ungefähr der doppelten Menge von 4 ng/kg Körpergewicht (Jung *et al.*, 2002) behandelt wurde. Interessanterweise wurde in derselben Arbeit bereits berichtet, dass lediglich die mehrmalige Applikation von DTX eine letale Wirkung zeigte. Möglicherweise lag diese beschriebene Sterblichkeit nicht in der wiederholten Applikation begründet, sondern viel mehr in der Zeit, die seit der ersten Applikation vergangen war.

Nachfolgend konzentrierte sich die Arbeit daher auf die Charakterisierung der infektionsunabhängigen Prozesse, die zu einer erhöhten Sterblichkeitsrate führen könnten. Aufgrund der i.t. Applikationsroute wurde hierbei als erstes untersucht, ob die erhöhte Sterblichkeit durch eine Schädigung des Lungengewebes verursacht wurde. Hierzu konnte mittels Lungenfunktionstests festgestellt werden, dass es nach

DTX Behandlung transgener Tiere zu einer Verschlechterung in der Elastizität des Lungengewebes kam. Dabei verschlechterten sich grade im Bereich der kleinen Atemwege die Dehnbarkeit des Gewebes sowie die Gewebselastizität. Die Betrachtung histologischer Lungenpräparate hierzu zeigte eine deutliche Verdickung des Interstitiums, ausgelöst durch die Infiltration von Immunzellen. Diese ließen sich teilweise auch in den Alveolen DTX-behandelter, transgener Tiere finden. Wobei derselbe Effekt auch in den PBS-behandelten Kontrolltieren sowie DTX-behandelten BALB/c Tieren beobachtet werden konnte. Die schlechtere Lungenfunktion in DTX-behandelten CD11cDTR Tieren wurde demnach höchst wahrscheinlich durch die deutliche Infiltration des Interstitiums ausgelöst.

Ein weiteres Resultat im Zusammenhang mit der *in vivo* Messung der Lungenfunktion war die ebenfalls auftretende Verschlechterung der Dehnbarkeit und Gewebselastizität der kleinen Atemwege in DTX-behandelten WT Tieren. Hierbei zeigten sich zwischen der PBS-behandelten Kontrollgruppe und den DTX-behandelten Tieren tendenziell dieselben Änderungen der Lungenparameter, wie in den CD11cDTR Tieren, mit und ohne DTX Behandlung. Aufgrund dessen ließ sich vermuten, dass die i.t. Applikation von DTX in WT Tiere, wenn sie auch keine depletierende Wirkung auf Zellen ausübte, dennoch einen Einfluss auf die Lungenfunktion zu haben schien. Da der endogene Mausezeptor als niedrigaffin beschrieben wurde (Bennett & Clausen, 2007) schien dies aber nachvollziehbar, denn bereits in früheren Studien wurde gezeigt, dass auch Mäuse, trotz der niedrigen Affinität des Rezeptors, bei sehr hohen Dosen sensitiv auf Diphtherietoxin reagieren (Pappenheimer & Randall, 1975).

Zusammenfassend waren die DTX induzierten Schäden an der Lunge transgener CD11c-DTR Tiere allerdings nicht gravierend genug um das Versterben der Tiere zu erklären.

5.4 Eine Behandlung mit DTX verursacht Blut-Neutrophilie und Azidose in CD11cDTR Tieren

Die Messung der Blutwerte, 96 h nach i.t. Applikation von DTX in CD11c-DTR Mäuse offenbarte eine deutliche Erhöhung der Anzahl an Leukozyten, wobei insbesondere die signifikant erhöhte Menge an N Φ in der Zirkulation einen klaren Hinweis auf eine akute Immunreaktion lieferte.

Dieselben Blutproben zeigten darüber hinaus auch eine deutliche Azidose, eine Übersäuerung des Blutes, in den DTX-behandelten CD11c-DTR Tieren. Dabei sanken neben dem pH-Wert auch die Werte für Bikarbonat und der Basenabweichung, bei gleichbleibendem Kohlenstoffdioxidpartialdruck. Die Tiere waren also weiterhin in der Lage CO₂ auszuatmen, womit gezeigt werden konnte, dass die Übersäuerung des Blutes nicht in Zusammenhang mit einer pulmonalen Störung stand, sondern einen metabolischen Ursprung haben musste. Die Ursache für metabolische Azidosen reichen dabei von diabetischen Stoffwechselstörungen bis zu einer Niereninsuffizienz, welche wiederum unter anderem durch Schockzustände und Unterernährung ausgelöst werden kann. Die genauen Ursachen für eine solche Azidose im DTX Modell konnten jedoch nicht identifiziert werden. Möglicherweise hatte aber die kontinuierliche Gewichtsabnahme der Versuchstiere innerhalb des Beobachtungszeitraums einen Einfluss auf das Ansäuern des Blutes, da auch Unterernährung zu einer Azidose führen kann (Hilton *et al.*, 2006; Kalantar-Zadeh *et al.*, 2004).

Die gleichbleibende Sauerstoffsättigung in allen Behandlungsgruppen unterstützte hingegen die Aussage, dass die Lungenfunktion in den DTX-behandelten CD11cDTR Tieren nicht nachhaltig beeinträchtigt war und nicht als Todesursache angesehen werden konnte.

5.5 Die Applikation von DTX induziert eine letale Infiltration des Myokards durch Störung der kardialen Reizweiterleitung im CD11cDTR Modell

Bei genauer Betrachtung der Vitalparameter während der Lungenfunktionsanalyse fiel auf, dass die Elektrokardiogramme der DTX-behandelten, transgenen Tiere unregelmäßiger waren, als die der unbehandelten Kontrolltiere. Dabei wurden die Abstände zwischen den einzelnen EKG Peaks immer größer, wobei die Höhe Peaks, gleichbedeutend mit der gemessenen Spannung, parallel dazu immer weiter abnahm bis schließlich die Signale im Laufe der Messung ganz aussetzten. Eine Abnahme der Spannung im QRS-Komplex ist dabei häufig mit kardiovaskulären Erkrankungen wie einer Myokarditis oder Flüssigkeitsansammlungen im Herzbeutel (Perikarderguss) assoziiert (Madias, 2008). Aber auch anatomisch Bedingte Störungen wie Thoraxpneumonien können eine Abnahme der Spannung im QRS-Komplex verursachen (Armen & Frank, 1949; Raev, 1996).

Da bei der Sektion der Tiere keine sichtbaren Veränderungen zu finden waren, wurde die These formuliert, dass die i.t. Applikation von DTX auch direkte Auswirkungen auf die Herzfunktion hatte. Die dazu folgende Untersuchung histologischer Präparate des Herzens zeigte tatsächlich sehr deutlich eine Infiltration des Herzmuskels mit verschiedenen Immunzellen. Eine durchflusszytometrische Phänotypisierung und Quantifizierung des immunologischen Infiltrats im Herzmuskel der DTX behandelten Tiere ergab, dass der Großteil der infiltrierenden Zellen durch NΦ repräsentiert wurde. Bereits zuvor wurde beschrieben, dass der Schweregrad einer akuten Myokarditis mit der Akkumulation von NΦ im Herz assoziiert ist (Afanasyeva *et al.*, 2004). Hierbei wurden zumeist sogenannte *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) im Zuge einer kardialen Gewebsverletzung, ausgelöst durch Pathogene oder Ischämien, gebildet, die wiederum NΦ rekrutierten (McDonald *et al.*, 2010). Freigesetzte DAMPs werden durch PRRs, z.B. auf Mastzellen im Herz (Frangogiannis *et al.*, 1998; Oka *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2010) erkannt, welche daraufhin mit der Freisetzung von TNFα (Frangogiannis *et al.*, 2002; Maekawa *et al.*, 2002) reagieren und die Rekrutierung der NΦ einleiten. Die in das Herz rekrutierten Zellen reagieren dort, wie bereits auch für andere Gewebe beschrieben (Barone *et al.*, 1991; Grommes & Soehnlein, 2011; Jordan *et al.*, 1999; Liesz *et al.*, 2011; Neumann *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2007), mit der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und verursachen dabei eine ausgeweitete Schädigung des Gewebes (Entman *et al.*, 1992).

Um zu klären, ob das Neutrophileninfiltrat auch im CD11cDTR Modell ursächlich für das Versterben der CD11c-Tiere war, sollten diese angeborenen Immunzellen parallel zur DTX Behandlung systemisch entfernt werden. Hierfür wurden die Tiere entweder zeitgleich mit der DTX Behandlung oder 24 h nach DTX Behandlung mit den NΦ-depletierenden Antikörpern anti-Ly6G oder anti-Gr-1 i.p. behandelt. Dieser Versuch ergab jedoch keine Auswirkungen auf die Überlebensrate der behandelten Tiere. Allerdings kann aus diesem Resultat nicht zwingend geschlossen werden, dass NΦ definitiv keinen Einfluss auf die Schädigung des Herzgewebes haben.

Möglicherweise waren die Depletionszeitpunkte falsch gewählt. Auch andere Arbeiten haben gerade den Depletionszeitpunkt von Neutrophilen als eminent wichtig für den Verlauf z.B. einer Infektion beschrieben. Mircescu *et al* konnten im Zuge einer pulmonalen Infektion mit *Aspergillus* zeigen, dass die Depletion von NΦ in

einem engen Zeitfenster von 24 h vor bis 3 h nach der Infektion entscheidend für das Überleben der Tiere war (Mircescu *et al.*, 2009). Wurden die NΦ später als 3h nach Infektion depletiert, hatte dies keine negativen Auswirkungen mehr auf das Gesamtüberleben der Tiere. Der Grundgedanke dieser Versuche war den Einfluss von NΦ und AM im Zuge einer pulmonalen Infektion mit *A. fumigatus* zu evaluieren. Dabei wurden die AM mit dem bereits beschriebenen System der Depletion über Clodronat Liposomen, durch sowohl i.p. als auch i.t. Injektion, depletiert. Hierbei zeigte sich, ebenso wie in der Diplomarbeit von Männ beschrieben, eine signifikante Reduktion der AM. Nach zusätzlicher i.t. Infektion wurde in diesen Tieren keine erhöhte Mortalität registriert, die Tiere überlebten in allen Fällen die Infektion, wobei bereits nach 3 Tagen in histologischen Präparaten der Lunge kaum noch Pilzstrukturen nachweisbar waren (vergleichbar mit PBS-behandelten, infizierten Tieren). Dieser Befund entsprach den in der Bachelorarbeit von Dalimot gezeigten Analysen zu den koloniebildenden Einheiten nach AM Depletion und Infektion (im Clodronatmodell). Auch für das DTX Modell konnte von Dalimot gezeigt werden, dass die Depletion der AMs keine Rolle bei der Infektabwehr von *A. fumigatus* spielten. Bei der Analyse der CFUs in diesem Modell wurde eine signifikante Abnahme der Pilzlast in der Lunge nachgewiesen, die sich nicht von nicht-depletierten Kontrollgruppen oder der Clodronatbehandlung unterschied.

Zusätzlich zeigten Mircescu *et al.* bei der Untersuchung des Einflusses von NΦ, dass der Zeitpunkt der Applikation des NΦ-depletierenden Antikörpers anti-Gr-1 entscheidend war. Bei infizierten, AM-depletierten Tieren konnte noch bis zu 3 h nach der Infektion durch die zusätzliche Applikation des NΦ-depletierenden Antikörpers eine pulmonale Aspergillose induziert werden. Dabei war bereits bekannt, dass die Depletion von NΦ über den NΦ-depletierenden Antikörper anti-Gr-1 die Anfälligkeit der Tiere für die Ausbildung einer pulmonalen Aspergillose massiv erhöhte (Mehrad *et al.*, 1999; Stephens-Romero *et al.*, 2005).

Die Depletion beider Zellsorten zeigte jedoch eine Besonderheit auf. Durch die systemische Applikation der Clodronat Liposomen wurde die anschließende Depletion von NΦ (durch i.p. Applikation von anti-Gr-1) inhibiert. Ein entscheidender Befund, der auch bei den in dieser Arbeit gezeigten NΦ-Depletionsversuchen eine Rolle spielen könnte. Mircescu *et al.* kamen dabei zu dem Schluss, dass die systemische Eliminierung phagozytotischer Zellen (Thakur *et al.*, 1996), durch die

Depletion mit Clodronat, den Abbau der durch den anti-Gr-1 Antikörper gekennzeichneten NΦ verhindert. Kontrollexperimente hierzu mit einer lokalen, i.t. Applikation der Clodronat Liposomen bestätigten diese Theorie, denn hierbei konnten NΦ durch die anschließende Applikation des anti-Gr-1 Antikörpers weiterhin depletiert werden, da die Depletion der Makrophagen lediglich auf die Lunge begrenzt war.

Anders als die Clodronat Liposomen, ist das in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Diphtherietoxin auch bei i.t. Applikation in seiner Wirkung möglicherweise nicht lokal begrenzt. Dies würde bedeuten, dass das Toxin aufgrund seiner Größe durchaus in der Lage ist auch in das System zu diffundieren und dort ebenfalls CD11cDTR positive Zellen zu depletieren. Die intramuskuläre Applikation des Toxins in Mäuse mit dem exogenen Diphtherietoxinrezeptor auf Hepatozyten (Saito *et al.*, 2001) zeigte eine Depletion dieser Leberzellen, was die Theorie der systemischen Ausbreitung des Toxins unterstützt. Demnach könnte dies bedeuten, dass die Neutrophilendepletion in den oben gezeigten Versuchen durch die vorangegangene Depletion der CD11c Zellen nicht stattgefunden hat und ihr Einfluss auf die Gewebeschädigung weiterhin unklar bleibt. Nähere Untersuchungen hierzu konnten jedoch belegen, dass sowohl bei zeitgleicher Applikation des NΦ depletierenden Antikörpers und DTX, sowie vorangegangener Depletion der NΦ (5 h prior) und anschließender Behandlung mit DTX, die NΦ im Blut nicht mehr nachweisbar waren. Die Überlebensrate innerhalb der DTX-behandelten Gruppe änderte sich dennoch nicht im positiven Sinne, sodass angenommen werden kann, dass die NΦ nicht allein ursächlich für den plötzlichen Tod der Tiere sind.

Neben der Infiltration selbst war auch die Verteilung der CD45 positiven Leukozyten im Herzen auffällig. Hier konnte mithilfe von Lichtblattemikroskopie an ganzen Herzen gezeigt werden, dass sich die Zellen in zentralen Bereichen für die Erregungsweiterleitung akkumulierten. Besonders im Übergang in die Purkinjefasern an der Herzspitze sowie im Bereich des Septums und um die Herzklappen herum, ließen sich vermehrt CD45 positive Zellen nachweisen. Fraglich war dabei, warum speziell diese Bereiche von der Infiltration betroffen waren. Möglicherweise lag der ursprüngliche Auslöser der Infiltration des Myokards in diesen Bereichen. Dies würde wiederum bedeuten, dass hier Zellen direkt auf das Toxin reagiert haben und demnach CD11cDTR positiv sein müssten. Neben den Kardiomyozyten, die für die

Erregungsleitung und Muskelkontraktion zuständig sind, gibt es im ruhenden Herzmuskel auch Immunzellen, wie z.B. Makrophagen und dendritische Zellen (Epelman *et al.*; Pinto *et al.*, 2012). Dabei wurde bereits gezeigt, dass sich CD11c positive Zellen im Bereich der Aorta und Aortenklappen finden lassen (Choi *et al.*, 2009). Der Untergang dieser Zellen durch DTX Applikation würde einen möglichen Mechanismus andeuten, warum es gerade in diesen Bereichen zur Akkumulation der infiltrierenden Zellen kommt.

Erste Versuche den endogenen Diphtherietoxinrezeptor, oder das daran gekoppelte GFP, über Antikörperfärbung und anschließender Analyse im Durchflusszytometer im CD11cDTR Modell nachzuweisen waren bisher jedoch nicht erfolgreich. Unabhängig davon war bereits auf den histologischen Gewebeschnitten ersichtlich, dass das kompakte Gewebe durch die Inflammation massiv geschädigt war. Dabei wurden neben den Infiltraten auch nekrotische Bereiche identifiziert, die vor allem in Hinblick auf die Erregungsweiterleitung zu Komplikationen führen mussten. Eine der Grundvoraussetzungen für eine adäquate Weiterleitung der Erregungswellen ist der Kontakt der Zellen untereinander. Dabei werden über *gap junctions* positive Ionen, wie beispielsweise Kalziumionen, aus einer bereits erregten Zelle an die Nachbarzelle weitergeben und lösen dort ebenfalls die Erregung aus (Silverthorn & Weber, 2009). Ist dieser Zellverband nun gestört ist davon auszugehen, dass auch die Weiterleitung der Erregungswellen beeinträchtigt ist.

Die Ableitung von Elektrokardiogrammen in DTX-behandelten CD11cDTR Tieren bestätigte eine Störung der Erregungsleitung, insbesondere bei der Repolarisation der Herzkammern. Zu sehen war hierbei ein negativer Einbruch der T-Welle, wie er beispielsweise auch im Typ 1 des Brugada-Syndroms beschrieben wurde. Bei dem Brugada-Syndrom handelt es sich um eine seltene Herzerkrankung die durch Herzrhythmusstörungen und Kammerflimmern gekennzeichnet ist. Zudem unterliegen Patienten mit dieser Erkrankung einem erhöhten Risiko an plötzlichem Herztod zu versterben. Ursächlich hierfür sind in über 30 % der Fälle genetische Anomalien in der Ausbildung der Ionenkanäle was zu einer Störung der Reizleitung im Herzen führt (Brugada, 1997; Brugada, 1992; Brugada *et al.*, 2014; Pfahnl *et al.*, 2007). Neben dem Brugada-Syndrom gibt es noch weitere Erkrankungen der Ionenkanäle mit einhergehenden Herzrhythmusstörungen. Oftmals liegen dabei Mutationen im Gen SCN5A, den codierenden Sequenzen der α -Untereinheit des

Natriumkanals, vor (Chen *et al.*, 1998; Schott *et al.*, 1999), die neben dem Brugada-Syndrom auch mit dem Long-QT-Syndrom Typ 3 (LQT3) (Lupoglazoff *et al.*, 2001), der fortgeschrittenen Erregungsleitungserkrankung (*progressive cardiac conduction disease* - PCCD) (Neu *et al.*, 2010) oder dem Sinusknotensyndrom assoziiert ist (Goldenberg & Moss, 2008; Ruan *et al.*, 2009; Smits *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2001). Dies könnte für das CD11cDTR Modell auch bedeuten, dass möglicherweise die Ionenkanäle selbst auf die Applikation von DTX reagieren. In der Originalpublikation zur CD11cDTR Mauslinie wird von über 20 Insertionsstellen im Genom berichtet (Jung *et al.*, 2002). Möglicherweise fand eine dieser Insertionen auch im Bereich des SCN5a Gens statt, wobei das Gen selbst dabei nicht zerstört worden sein kann, andernfalls würden auch unbehandelte CD11cDTR Mäuse eine der o.g. Erkrankungen zeigen. Eine vollständige Sequenzierung des CD11cDTR Genoms könnte hier größere Klarheit schaffen und möglicherweise bisher unbekannte Loci identifizieren, die für die Entstehung einer derart ausgeprägten Myokardinfiltration bedeutsam sind. Ausgeschlossen werden kann hingegen, dass die CD11cDTR Maus ein generelles Problem bei massivem Zelltod hat. Die Experimente zu Depletion mit Clodronat Liposomen, sowie NΦ-Depletion durch anti-Ly6G, zeigten keinerlei Beeinträchtigung der Überlebensrate in der CD11cDTR Maus.

Die Beobachtung, dass es nach einer massiven Leukozyteninfiltration zur Ausbildung einer gravierenden Schädigung des Myokards kam legte die Vermutung nahe, dass diese Herzschädigung immunzellvermittelt entstand. Um diese These zu untersuchen wurden von unserer Kollaborationspartnerin Nora Kochupurakkal, an der Klinik für Kardiologie des Universitätsspitals Zürich, in der AG Eriksson, Untersuchungen mit Knochenmarkschimären durchgeführt. In bisher nicht veröffentlichten Versuchen wurden dabei KM-Chimären generiert, indem bestrahlte C57/BL6 Mäuse mit Knochenmark der transgenen CD11cDTR Tiere rekonstituiert wurden. Nach Applikation von DTX zeigten sich keinerlei CD45 positiven Zellinfiltrate bei der durchflusszytometrischen Analyse des Herzmuskels. Im Gegenzug konnten bei KM-Chimären aus transgenen Empfängertieren (CD11cDTR), welche mit Knochenmark aus WT Donormäusen rekonstituiert wurden, nach einer DTX Behandlung deutliche Infiltrationen des Herzmuskels durch CD45 positive Zellen beobachtet werden.

Auch wenn die Mortalität in diesem Experiment nicht direkt untersucht wurde, könnte diese Infiltration von Immunzellen in die Herzen der KM-Chimären ebenfalls mit einer erhöhten Mortalität assoziiert sein, die in der Arbeit von Zaft *et al.* (Zaft *et al.*, 2005) beschrieben wurde. Nichts desto trotz zeigten die Experimente mit KM-Chimären, dass der Auslöser für die Myokardinfiltration strahlungsresistente Zellen sein mussten, die vermutlich nicht dem hämatopoetischen System angehörten oder zumindest nicht transplantierbar waren. Es wäre denkbar, dass es sich bei diesen Initiatorzellen um CD11c positive dendritische Zellen handeln könnte (Choi *et al.*, 2009; Epelman *et al.*, 2015). Alternativ wäre es aber auch denkbar, dass es gewebständige, CD11c positive, Makrophagen sind (Epelman *et al.*, 2014), die nach DTX-vermittelter Depletion ein Immunzellinfiltrat und eine dadurch vermittelte Muskelzellschädigung hervorrufen. Dabei scheinen kardiale Makrophagen jedoch gleichmäßig im gesamten Muskel verteilt zu sein (Pinto *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2012). Eine Depletion der Zellen über DTX sollte demnach auch eine gleichmäßigere Verteilung infiltrierender Leukozyten verursachen. Möglicherweise werden aber lediglich Subpopulationen der kardialen Makrophagen depletiert, von denen bisher vier verschiedene beschrieben wurden (Epelman *et al.*, 2014). Zumindest eine dieser F4/80⁺ Subpopulation wurde dabei auch als CD11c^{hi} beschrieben, wobei ihre Lage im Myokard nicht näher erläutert wurde. Allerdings wurden diese Zellen in anderen Publikationen als möglicherweise den dendritischen Zellen zugehörig diskutiert (Molawi *et al.*, 2014; Tamoutounour *et al.*).

Unabhängig davon bestätigt die Literatur jedoch das Vorhandensein CD11c positiver Zellen im Herzmuskel, deren Akkumulation im Bereich der Herzklappen beobachtet wurde (Choi *et al.*, 2009). Die Möglichkeit, dass diese Zellen, ob sie nun Makrophagen oder dendritische Zellen sind, nach einer Depletion den Ursprung für die Infiltration des Myokards bilden, ist demnach gegeben. Weitere Versuche sind jedoch notwendig, um zwischen diesen Zellen und dem, vermutlich tödlichen, kardialen Immuninfiltrat einen Zusammenhang herzustellen. Dennoch, sollten diese kardialen CD11c positiven Zellen der Auslöser der Infiltration sein, müsste diese sich ebenso in anderen CD11cDTR positiven Linien, wie der CD11c.Luci.DTR Maus (Tittel *et al.*, 2012) oder der CD11c.DOG Maus (Hochweller *et al.*, 2008), induzieren lassen.

5.6 Kontroverse Ergebnisse in der Literatur

Die Originalpublikation der CD11c-DTR Maus (Jung *et al.*, 2002) wurde bisher über 1000 Mal zitiert (Stand: August 2015). Darunter befanden sich Verweise auf die in der Originalpublikation gewonnenen Erkenntnisse, aber es auch weiterführende Veröffentlichungen, die ebenfalls auf Verwendung des CD11cDTR Mausmodells basierten. Thematisch lassen sich die meisten dieser Arbeiten immunologischen Fragestellungen aus dem Bereich der asthmatischen Lungenerkrankung sowie dem Einfluss Dendritischer Zellen (DC) auf späte Immunantwort zuordnen. Bedenkt man die in der vorliegenden Arbeit erstmals charakterisierte Infiltration des Myokards nach reiner DTX Behandlung der Tiere, muss dieser Befund unweigerlich zu einer kritischen Betrachtung der bislang publizierten Arbeiten führen.

Beispielsweise wurde in einer Publikation von 2006 die Rolle von Dendritischen Zellen bei einer *Herpes simplex* Infektion untersucht (Kassim *et al.*, 2006). Kassim *et al.* zogen hierbei den Schluss, dass die Depletion Dendritischer Zellen in CD11cDTR Mäusen zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber der Virusinfektion führte. Zwar konnte nach DC Depletion über DTX Gabe eine erhöhte Viruslast in diesen Tieren festgestellt werden, dennoch bleibt zu klären, ob die erhöhte Mortalität wirklich durch die Infektion oder durch eine Infiltration des Myokards hervorgerufen wurde. Schindler *et al.* postulierten 2012 die zentrale Rolle von Dendritischen Zellen als Koordinatoren von Immunreaktionen bei einer Infektion mit *Staphylokokkus aureus* (Schindler *et al.*, 2012), indem die DCs sowohl das Einwandern von NΦ regulieren, als auch die bakterizide Wirkung dieser Zellen steigern. In dieser Studie kamen die Autoren zu dem Schluss, dass das Fehlen Dendritischer Zellen nach DTX Depletion eine erhöhte, infektionsbedingte Inflammation des Herzmuskels auslöste (24 h nach Infektion). Dieser Befund könnte allerdings auch direkt mit einer Immunzellrekrutierung aufgrund der reinen DTX Behandlung zusammenhängen. Milam *et al.* verwendeten 2010 das CD11cDTR Mausmodell in einer Studie, die CD11c positive Zellen als unabdingbar für den Schutz eines Organismus vor einer akuten Lungenschädigung (*acute lung injury* – ALI) beschrieben (Milam *et al.*, 2010). In dieser Arbeit wurden CD11cDTR Tiere i.p. mit jeweils 5 ng/g Körpergewicht DTX behandelt und die gewünschte ALI-Symptomatik durch i.t. Applikation von Lipopolysaccharid (LPS) induziert. Innerhalb dieser Gruppe wurde eine Mortalität von 100 % detektiert, wohingegen die PBS vorbehandelte Kontrollgruppe nach LPS

Applikation zu 100 % überlebte. Auch hier ergab sich die Frage, ob die erhöhte Mortalität in der DTX/LPS Gruppe nicht durch die alleinige Zelldepletion mittels DTX ausgelöst wurde. Eine weitere, transgene Kontrollgruppe dieser Studie wurde mit DTX ohne LPS behandelt. Dies führte, ähnlich wie in den Experimenten der vorliegenden Dissertationsschrift, zu einer DTX-vermittelten Letalität von 20 %. Dieser Befund wurde in der Publikation allerdings nicht weiter diskutiert.

Eine weitere interessante Beobachtung bei Milam *et al.* war, dass die Applikation von LPS in DTX vorbehandelte CD11c-Tiere den Tod der Tiere schneller herbeiführte, als in der nicht LPS-behandelten Kontrollgruppe. Auch dieser Effekt korrelierte mit den Resultaten der AG Gunzer. Die zusätzliche Infektion der DTX-behandelten, transgenen Tiere mit *A. fumigatus* resultierte in einem Eintreten des Todes ab Tag 2 nach Infektion, wohingegen die alleinige DTX Applikation zu einem Todeseintritt ab Tag 4 nach Mock-Infektion führte. Möglicherweise überforderte der zusätzliche, inflammatorische Stimulus den Organismus nach vorangegangener Zelldepletion derart, dass der Tod schneller eintrat. Speziell emotionale oder stressige Situationen, sowie Infektionen, können unabhängig von einer Vorbelastung bereits einen Myokardinfarkt verursachen (Chi & Kloner, 2003; Smeeth *et al.*, 2004; Warren-Gash *et al.*, 2012). Auch andere Veröffentlichungen in denen die CD11cDTR Maus Anwendung fand, konnten ein schnelleres Versterben der Versuchstiere bei Kombination aus Zelldepletion und inflammatorischem Stimulus feststellen (Schindler *et al.*, 2012).

Auffällig an den Versuchsergebnissen von Milam *et al.* war auch die Sterblichkeitsrate nach DTX-Behandlung (Milam *et al.*, 2010). In den Kontrollexperimenten dieser Publikation überlebten 80 % der allein mit DTX-behandelten CD11cDTR Mäusen wohingegen die Sterblichkeitsrate in der vorliegenden Dissertation bei 100 % lag. Weitere Arbeiten fanden ebenfalls abweichende Mortalitätsraten. So überleben DTX behandelte, transgene Tiere in der 2013 publizierte Arbeit zum Einfluss Dendritischer Zellen auf die Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit *Cryptosporidium parvum* (Bedi *et al.*, 2014) zu 70 % über einen Zeitraum von 7 Tagen, trotz zusätzlicher Infektion. Messungen bei einer Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* zeigten nach Zelldepletion sogar ein Überleben bis zu 21 Tage, wobei dabei nicht direkt Überlebenskurven bestimmt wurden (Tian *et al.*, 2005). Auch eine Arbeit zur Infektion mit dem humanen T-Zell-

Leukämie-Virus Typ 1 (*human T cell leukemia virus type 1* – HTLV-1) zeigte eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber der zell-freien Infektion DTX behandelter CD11cDTR Mäuse (Rahman *et al.*, 2010). Bei dieser zell-freien Infektion wurde der Virus aus dem Überstand und dem Lysat von HEK293 Zellen gewonnen, die zuvor mit dem Virusgenom transfiziert worden waren. Hierbei verstarben 40 % der zell-frei infizierten Tiere innerhalb von 5 Tagen, wohingegen DTX behandelte und zell-assoziiert infizierte Tiere (infiziert mit transfizierten HEK293 Zellen) keinerlei Gewichtsverlust (wie üblich nach der Depletion) oder erhöhte Mortalität aufwiesen (Überlebensrate 100 % innerhalb des Beobachtungszeitraums). Zusammenfassend ergaben diese Publikationen ein völlig unterschiedliches Verhalten der CD11cDTR Mäuse hinsichtlich der Sterberate nach Behandlung mit DTX. Die Erklärung für diesen Befund ist vermutlich multifaktoriell. Zwischen den Arbeiten unterschieden sich beispielsweise die DTX Applikationsroute (i.p. vs. i.t.) und auch die Mengen an appliziertem DTX (2 -12 ng/g Körpergewicht), sowie der genetische Hintergrund der Tiere (BALB/c vs. C57BL/6 Hintergrund, heterozygot vs. homozygot). All diese Parameter schienen einen Einfluss auf die Überlebensrate der Tiere zu haben. So konnte in einigen Versuchen nach der i.t. Applikation von 50 ng statt 100 ng DTX pro Tier beobachtet werden, dass die Mortalität zwar immer noch bei 100 % lag, der Tod aber durchschnittlich einen Tag später eintrat. Neben der Toxinmenge hatte auch der genetische Hintergrund der Tiere einen Einfluss auf die Mortalitätsrate. Milam *et al.* verwendeten sowohl CD11cDTR Tiere auf C57BL/6, als auch auf BALB/c Hintergrund. Die Sterblichkeitsrate nach Zelldepletion und ALI betrug bei beiden Linien zwar 100 %, setzte bei Tieren mit BALB/c Hintergrund aber bereits einen Tag früher ein. Eine persönliche Kommunikation mit Dr. Kochupurakkal ergab, dass auch sie in früheren Experimenten deutliche Unterschiede zwischen den beiden genetischen Hintergründen sah. Sie fand sogar deutlich niedrigere Sterblichkeitsraten bei CD11cDTR transgenen Tieren auf C57BL/6 Hintergrund.

5.7 Alternative Mausmodelle

Neben den bereits bekannteren Schwächen des CD11cDTR Systems, wie dem durch die Depletion ausgelösten Neutrophileneinstrom (Tittel *et al.*, 2012), konnten hier weitere Probleme des Modells aufgezeigt werden. Als Alternative zur CD11cDTR Maus werden inzwischen jedoch weitere transgene Modelle wie die CD11c.Luci.DTR (Tittel *et al.*, 2012) oder die CD11c.DOG Maus (Hochweller *et al.*, 2008) beschrieben,

die ebenfalls die Depletion von CD11c positiven Zellen über die Applikation von DTX zulassen. Zudem ist für die CD11c.Luci.DTR Maus bekannt, dass diese beispielsweise nicht von der frühen Infiltration von NΦ in das Gewebe betroffen ist (Tittel *et al.*, 2012). Auch die Verwendung von Knochenmarkschimären aus der CD11cDTR Maus wäre eine mögliche Alternative, bei der die letalen Konsequenzen der Depletion umgangen werden könnten (Zaft *et al.*, 2005), da diese offenbar im Zusammenhang mit strahlungsresistenten Zellen der CD11cDTR Maus stehen und nicht abhängig vom hämatopoetischen System sind. Allerdings muss beachtet werden, dass möglicherweise funktionell bedeutsame Zellpopulationen im Gewebe bei Transplantationsexperimenten nicht mit übertragen werden und ihre tatsächliche Rolle für ein Phänomen dann übersehen wird.

5.8 Alternative Nutzung der CD11cDTR Maus

Unabhängig von der Interpretation bisheriger Versuche im CD11cDTR Modell, bieten die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse möglicherweise völlig neue Perspektiven zur Verwendung der CD11cDTR Mauslinie. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Depletion zumindest in Mäusen auf BALB/c Hintergrund zu unterschiedlich stark ausgeprägten Formen der Schädigung des Myokards führt, die in 100 % der Fälle den Tod der Tiere zur Folge hatte. Dabei konnten neben den pathologischen Auffälligkeiten im Herzmuskelgewebe auch Abnormitäten im Verlauf des EKGs für besagte Tiere gemessen werden, sodass diese Mauslinie vielleicht zukünftig als Modellorganismus für vergleichbare Auffälligkeiten beim Mensch dienen könnte. Als Beispiel hierfür könnte das Brugada-Syndrom (Brugada *et al.*, 2014) dienen, eine ionenkanalbedingte Herzerkrankung, dessen Typ 1 als Charakteristikum wie die CD11cDTR Mäuse eine negative T-Welle im Elektrokardiogramm aufweist. Eine hierzu bereits verwendete Mauslinie ist die Scn5a k.o.-Maus (Derangeon *et al.*, 2012; Papadatos *et al.*, 2002). Bei dieser Linie wurde der kardiale Natriumkanal durch die Null-Mutation des für die α -Untereinheit des Natriumkanals codierenden Gens Scn5a deletiert, was zu einer verminderten Anzahl an Natriumkanälen und diversen Defekten wie beispielsweise beeinträchtigter Reizweiterleitung im atrioventrikulären Bereich führte (Papadatos *et al.*, 2002). Der Vorteil bei der Verwendung der CD11cDTR Maus wäre die Möglichkeit den Defekt zu induzieren, wohingegen die Scn5a von Anfang an diesen Defekt aufweist, was bei homozygoten Tieren dieser Linie sogar zu einer embryonalen Letalität führt (Papadatos *et al.*, 2002). Damit

könnte die CD11cDTR Maus vielleicht zukünftig als induzierbares Modell für die Infiltration des Myokards mit Immunzellen in der Forschung Anwendung finden.

5.9 Fazit

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Suszeptibilität der CD11cDTR Mäuse gegenüber der Infektion mit *Aspergillus fumigatus* nicht, wie bisher angenommen, durch die Infektion bedingt war. Eine zentrale Beobachtung dieser Arbeit war, dass die einmalige Behandlung der CD11cDTR Tiere mit DTX, ohne zusätzliche Infektion, bereits letal wirkte. Zwar wurde für dieses Mausmodell bereits berichtet, dass eine repetitive Applikation des Toxins zum Tod der Versuchstiere führen kann (Jung *et al.*, 2002), in der selben Publikation wird aber in Bezug auf Langzeiteffekte auch explizit erwähnt, dass diese bei einmaliger Applikation des Toxin nicht festgestellt werden konnten. Bislang völlig ungeklärt waren bisher hingegen auch die Mechanismen, welche dieser erhöhten Mortalität zu Grunde lagen. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst beschrieben, dass sich die erhöhte Sterblichkeitsrate nicht mit einer Unterfunktion der Lunge behandelte Tiere erklären ließ. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass es nach i.t. DTX Applikation auch zu pathologischen Veränderungen im Herzmuskel kam. Neben einer drastischen Schädigung des Myokards, gekennzeichnet durch Infiltration von Leukozyten (speziell Neutrophile Granulozyten) in den Herzmuskel und der daraus resultierenden Nekrose des Gewebes, wurde exemplarisch visualisiert, dass CD45 positive Zellen primär in Bereichen der kardialen Reizweiterleitung akkumulierten. Ob die Infiltration dieser Zellen allerdings ursächlich für die Störung in der Reizweiterleitung ist oder ob sie, bedingt durch eine gestörte Reizweiterleitung, als eine Art Nebeneffekt auftritt, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden.

Ausgehend von diesen Ergebnissen ließ sich formulieren, dass die CD11cDTR Maus, ohne Klärung des zugrundeliegenden Mechanismus, nur unter Vorbehalt für Zelldepletionsstudien verwendet werden sollte. Selbst bei kurzzeitiger Betrachtung von wenigen Tagen nach DTX Behandlung sind die Einflüsse der Myokardschädigung und der Herzrhythmusstörungen auf andere immunologische Prozesse nicht bekannt, sodass die Experimentaldaten, welche mit dieser Maus getroffen werden, stets anzweifelbar wären.

6. Ausblick

Aus dem experimentellen Teil dieser Arbeit ging hervor, dass die Applikation von DTX in das transgene Mausmodell CD11cDTR zu einer schweren Schädigung des Myokards mit Todesfolge führte. Ungeklärt bleibt jedoch die Frage, welchen Zellen in der CD11cDTR Maus den massiven Einstrom an Leukozyten in das Myokard nach DTX Gabe verursachten. Am wahrscheinlichsten handelte es sich dabei um Zellen im Myokard, die ebenfalls den Primaten-Diphtherietoxinrezeptor exprimieren und durch die Behandlung mit DTX eliminiert werden. In Folge dessen wurden Leukozyten in den Bereich der apoptotischen Zellen rekrutiert und verursachten dort schwerwiegende Schäden am Gewebe und störten die Polarisation des Herzens.

Zunächst wäre daher zu klären, welche Zellen auf das DTX reagierten. Hier wurden bereits CD11c positive Zellen in der transgenen Linie CD11c-EYFP identifiziert (Choi *et al.*, 2009), die im Bereich der Aortenklappen zu finden waren, mithin also in der CD11cDTR Maus ebenfalls nachgewiesen werden müssten. Der Nachweis könnte dabei beispielsweise über das an den DTR gekoppelte GFP erfolgen, wobei sowohl durchflusszytometrische als auch histologische Analysen möglich wären, die sowohl die Quantität dieser Zellen als auch ihre Lage im Gewebe identifizieren könnten. Auch die Analyse des gesamten Herzmuskels im Lichtblattemikroskop im Hinblick auf diese CD11cDTR positiven Zellen wäre eine Möglichkeit die Lage und Quantität dieser Zellen zu bestimmen. Der Nachweis des exogenen Diphtherietoxinrezeptors könnte ebenfalls zur Identifizierung der transgenen Zellen beitragen, wobei die histologische Färbung mittels des humanen anti-HBEGF (*heparin-binding EGF-like growths factor*) Antikörpers in Versuchen der AG Gunzer auch ein positives Signal in WT Kontrolltieren aufzeigte. Daher ist anzunehmen, dass es zu einer Kreuzreaktivität des Antikörpers zwischen dem humanen. bzw. aus dem Affen stammenden Rezeptor gegenüber dem endogenen Mausrezeptor kommt. Sind die Zellen identifiziert, müsste über bspw. *in vitro* Versuche mit Zellisolaten aus dem Myokard der Beweis erbracht werden, dass diese Zellen tatsächlich apoptotisch auf das DTX reagieren. Hierfür gibt es diverse Assays, die die Menge an apoptotischen oder nekrotischen Zellen *in vitro* bestimmen (Darzynkiewicz *et al.*, 2008; Riccardi & Nicoletti, 2006).

Die Alternative zu den *in vitro* Experimenten, wäre eine *in vivo* Studie, bei der das Herz einer CD11cDTR Maus in ein gesundes Spendertier transplantiert wird, um

anschließend die Auswirkungen einer DTX Applikation auf das transplantierte Herz zu dokumentieren. Dabei wird die Aorta des Spenderherzens an die abdominale Aorta des Empfängertieres gekoppelt (Hasegawa *et al.*, 2007). Die Pulmonalarterie des Spenders wiederum wird mit der Hohlvene (*vena cava inferior*) des Empfängertieres, ebenfalls im Abdominalbereich, verbunden. Das so transplantierte Herz des Spendertieres kann dabei bis zu ein Jahr vom Empfängerorganismus versorgt und dementsprechend lang untersucht werden (Corry, 1973). Die Vorteile hierbei wäre die Betrachtung sämtlicher im Herz vorkommenden Zellen, vollkommen losgelöst vom Immunsystem des Spendertieres.

Nach wie vor könnte es aber auch sein, dass das CD11cDTRGFP-Konstrukt der CD11cDTR Mauslinie an einer bisher nicht näher charakterisierten Stelle im Genom inseriert hat. Eine komplette Sequenzierung der Linie wäre daher hilfreich um sämtliche Insertionsstellen (über 20 (Jung *et al.*, 2002)) zu offenbaren. Es besteht die Möglichkeit, dass einige dieser Insertionen so stattgefunden haben, dass essentielle Gene für Zellen des Myokards betroffen sind, sodass der Auslöser der Myokardinfiltration nicht die regulären CD11c-positiven Zellen im Herzmuskel waren, sondern möglicherweise eine geringere Stressresistenz von Kardiomyozyten im Rahmen eines umfassenden Zellsterbens nach DTX Gabe. Auch die Ionenkanäle könnten direkt betroffen sein, wobei nicht davon auszugehen ist, dass eine falsche Insertion in Bereichen der codierten Sequenzen, einen kompletten Funktionsverlust verursacht hat. Eine solche Mutation wäre in homozygoten Tieren letal und würde in heterozygoten Tieren bereits ohne DTX Applikation zu Auffälligkeiten führen (Papadatos *et al.*, 2002). Um die Ursachen der Myokardinfiltration einzugrenzen sollten sämtliche Beobachtungen an den alternativen Mausmodellen CD11c.Luci.DTR und CD11c.DOG überprüft werden.

7. Referenzen

7.1 Internetquellen

- 1001 <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clodronate#section=Top>
- 1002 clodronateliposomes.org
- 1003 <http://jaxmice.jax.org/strain/001800.html>
- 1004 <http://Radiopaedia.org> (Case courtesy of Dr. Frank Gaillard)
- 1005 <http://www.netdoktor.de/Diagnostik+Behandlungen/Untersuchungen/Elektrokardiografie-EKG-249.html>
- 1006 <http://www.visualsonics.com/products/imaging-stations>
- 1007 http://www.giga.ulg.ac.be/upload/docs/image/jpeg/2009-10/picture_2_sandra.jpg
- 1008 <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C6827>

7.2 Referenzliste

- Afanasyeva, Georgakopoulos, Belardi, Ramsundar, Barin, Kass, *et al.* (2004). Quantitative Analysis of Myocardial Inflammation by Flow Cytometry in Murine Autoimmune Myocarditis : Correlation with Cardiac Function. *The American Journal of Pathology*, 164(3), 807-815.
- Arango Duque, & Descoteaux. (2014). Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol*, 5, 491. doi: 10.3389/fimmu.2014.00491
- Armen, & Frank. (1949). Electrocardiographic patterns in pneumothorax. *Chest*, 15(6), 709-719. doi: 10.1378/chest.15.6.709
- Bacon. (2001). Chemokine/Chemokine Receptor Nomenclature. *Journal of Leukocyte Biology*, 70(3), 465-466.
- Barone, Hillegass, Price, White, Lee, Feuerstein, *et al.* (1991). Polymorphonuclear leukocyte infiltration into cerebral focal ischemic tissue: Myeloperoxidase activity assay and histologic verification. *Journal of Neuroscience Research*, 29(3), 336-345. doi: 10.1002/jnr.490290309
- Becker, Jahrling, Kramer, Schnorrer, & Dodt. (2008). Ultramicroscopy: 3D reconstruction of large microscopical specimens. *J Biophotonics*, 1(1), 36-42. doi: 10.1002/jbio.200710011
- Bedi, McNair, & Mead. (2014). Dendritic cells play a role in host susceptibility to *Cryptosporidium parvum* infection. *Immunology Letters*, 158(1-2), 42-51. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2013.11.015>
- Behnsen, Narang, Hasenberg, Gunzer, Bilitewski, Klippel, *et al.* (2007). Environmental dimensionality controls the interaction of phagocytes with the pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *PLoS Pathog*, 3(2), e13. doi: 10.1371/journal.ppat.0030013
- Bello, & Sotomayor. (2007). Monoclonal Antibodies for B-Cell Lymphomas: Rituximab and Beyond. *ASH Education Program Book*, 2007(1), 233-242. doi: 10.1182/asheducation-2007.1.233

- Ben-Yehuda, Bader, Puxeddu, Levi-Schaffer, Breuer, & Berkman. (2008). Airway Eosinophil Accumulation and Eotaxin-2/CCL24 Expression Following Allergen Challenge in BALB/c Mice. *Experimental Lung Research*, 34(8), 467-479. doi: 10.1080/01902140802220625
- Bennett, & Clausen. (2007). DC ablation in mice: promises, pitfalls, and challenges. *Trends Immunol*, 28(12), 525-531. doi: 10.1016/j.it.2007.08.011
- Bhatia, Fei, Yarlagadda, Qi, Akira, Saijo, *et al.* (2011). Rapid host defense against *Aspergillus fumigatus* involves alveolar macrophages with a predominance of alternatively activated phenotype. *PLoS One*, 6(1), e15943. doi: 10.1371/journal.pone.0015943
- Bode, Albrecht, Haussinger, Heinrich, & Schaper. (2012). Hepatic acute phase proteins--regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-kappaB-dependent signaling. *Eur J Cell Biol*, 91(6-7), 496-505. doi: 10.1016/j.ejcb.2011.09.008
- Borregaard, & Kragballe. (1980). Role of oxygen in antibody-dependent cytotoxicity mediated by monocytes and neutrophils. *Journal of Clinical Investigation*, 66(4), 676-683.
- Bouabe, & Okkenhaug. (2013). Gene Targeting in Mice: a Review. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1064, 315-336. doi: 10.1007/978-1-62703-601-6_23
- Brandes, Klauschen, Kuchen, & Germain. (2013). A Systems Analysis Identifies a Feed-forward Inflammatory Circuit Leading to Lethal Influenza Infection. *Cell*, 154(1), 197-212. doi: 10.1016/j.cell.2013.06.013
- Brinkmann, & Zychlinsky. (2007). Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Micro*, 5(8), 577-582.
- Brown, Herre, Williams, Willment, Marshall, & Gordon. (2003). Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med*, 197(9), 1119-1124. doi: 10.1084/jem.20021890
- Brown, Taylor, Reid, Willment, Williams, Martinez-Pomares, *et al.* (2002). Dectin-1 Is A Major - Glucan Receptor On Macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, 196(3), 407-412. doi: 10.1084/jem.20020470
- Brugada. (1992). Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: A distinct clinical and electrocardiographic syndrome: A multicenter report. *Journal of the American College of Cardiology*, 20(6), 1391-1396. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0735-1097\(92\)90253-J](http://dx.doi.org/10.1016/0735-1097(92)90253-J)
- Brugada. (1997). Further Characterization of the Syndrome of Right Bundle Branch Block, ST Segment Elevation, and Sudden Cardiac Death. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 8(3), 325-331. doi: 10.1111/j.1540-8167.1997.tb00796.x
- Brugada, Brugada, & Brugada. (2005). Patients With an Asymptomatic Brugada Electrocardiogram Should Undergo Pharmacological and Electrophysiological Testing. *Circulation*, 112(2), 279-292. doi: 10.1161/circulationaha.104.485326
- Brugada, Campuzano, Sarquella-Brugada, Brugada, & Brugada. (2014). BRUGADA SYNDROME. *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal*, 10(1), 25-28.
- Bruns, Kniemeyer, Hasenberg, Aimagianda, Nietzsche, Thywißen, *et al.* (2010). Production of Extracellular Traps against *Aspergillus fumigatus* In Vitro and in Infected Lung Tissue Is Dependent on Invading Neutrophils and Influenced by Hydrophobin RodA. *PLoS Pathog*, 6(4), e1000873. doi: 10.1371/journal.ppat.1000873
- Castell, Gómez-Lechón, David, Andus, Geiger, Trullenque, *et al.* (1989). Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Letters*, 242(2), 237-239. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80476-4](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(89)80476-4)
- Chabi, Goracci, Roche, Paugam, Lupo, & Revel. (2015). Pulmonary aspergillosis. *Diagn Interv Imaging*, 96(5), 435-442. doi: 10.1016/j.diii.2015.01.005
- Chen, Kirsch, Zhang, Brugada, Brugada, Brugada, *et al.* (1998). Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature*, 392(6673), 293-296.
- Chi, & Kloner. (2003). Stress and myocardial infarction. *Heart*, 89(5), 475-476.
- Choi, Do, Cheong, Koh, Boscardin, Oh, *et al.* (2009). Identification of antigen-presenting dendritic cells in mouse aorta and cardiac valves. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(3), 497-505. doi: 10.1084/jem.20082129

- Chuquimia, Petursdottir, Rahman, Hartl, Singh, & Fernández. (2012). The Role of Alveolar Epithelial Cells in Initiating and Shaping Pulmonary Immune Responses: Communication between Innate and Adaptive Immune Systems. *PLoS One*, 7(2), e32125. doi: 10.1371/journal.pone.0032125
- Collier. (1975). Diphtheria toxin: mode of action and structure. *Bacteriological Reviews*, 39(1), 54-85.
- Conroy, & Williams. (2001). Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung. *Respiratory Research*, 2(3), 150 - 156.
- Corry. (1973). Primarily vascularized allografts of hearts in mice. The role of H-2D, H-2K, and non-H-2 antigens in rejection. *Transplantation*(16), 343–350.
- Darzynkiewicz, Galkowski, & Zhao. (2008). Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods (San Diego, Calif.)*, 44(3), 250-254. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.11.008
- Dennehy, & Brown. (2007). The role of the beta-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J Leukoc Biol*, 82(2), 253-258. doi: 10.1189/jlb.1206753
- Derangeon, Montnach, Baró, & Charpentier. (2012). Mouse Models of SCN5A-Related Cardiac Arrhythmias. *Frontiers in Physiology*, 3, 210. doi: 10.3389/fphys.2012.00210
- Dubourdeau, Athman, Balloy, Huerre, Chignard, Philpott, *et al.* (2006). *Aspergillus fumigatus* Induces Innate Immune Responses in Alveolar Macrophages through the MAPK Pathway Independently of TLR2 and TLR4. *The Journal of Immunology*, 177(6), 3994-4001. doi: 10.4049/jimmunol.177.6.3994
- Eash, Greenbaum, Gopalan, & Link. (2010). CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest*, 120(7), 2423-2431. doi: 10.1172/JCI41649
- Entman, Youker, Shoji, Kukielka, Shappell, Taylor, *et al.* (1992). Neutrophil induced oxidative injury of cardiac myocytes. A compartmented system requiring CD11b/CD18-ICAM-1 adherence. *Journal of Clinical Investigation*, 90(4), 1335-1345.
- Epelman, Lavine, Beaudin, Sojka, Carrero, Calderon, *et al.* Embryonic and Adult-Derived Resident Cardiac Macrophages Are Maintained through Distinct Mechanisms at Steady State and during Inflammation. *Immunity*, 40(1), 91-104. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.019
- Epelman, Lavine, Beaudin, Sojka, Carrero, Calderon, *et al.* (2014). Embryonic and Adult-Derived Resident Cardiac Macrophages Are Maintained through Distinct Mechanisms at Steady State and during Inflammation. *Immunity*, 40(1), 91-104. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.019
- Epelman, Liu, & Mann. (2015). Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair. *Nat Rev Immunol*, 15(2), 117-129. doi: 10.1038/nri3800
- Ertürk, Becker, Jährling, Mauch, Hojer, Egen, *et al.* (2012). Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat. Protocols*, 7(11), 1983-1995. doi: <http://www.nature.com/nprot/journal/v7/n11/abs/nprot.2012.119.html#supplementary-information>
- Fahy, & Dickey. (2010). Airway Mucus Function and Dysfunction. *New England Journal of Medicine*, 363(23), 2233-2247. doi: doi:10.1056/NEJMra0910061
- Flanagan. (1966). 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genetics Research*, 8(03), 295-309. doi: doi:10.1017/S0016672300010168
- Fleck, & Brock. (2010). *Aspergillus fumigatus* catalytic glucokinase and hexokinase: expression analysis and importance for germination, growth, and conidiation. *Eukaryot Cell*, 9(7), 1120-1135. doi: 10.1128/EC.00362-09
- Fleisch. (2000). *Bisphosphonates in Bone Disease*. San Diego: Academic Press.
- Frangogiannis, Lindsey, Michael, Youker, Bressler, Mendoza, *et al.* (1998). Resident Cardiac Mast Cells Degranulate and Release Preformed TNF- α , Initiating the Cytokine Cascade in Experimental Canine Myocardial Ischemia/Reperfusion. *Circulation*, 98(7), 699-710. doi: 10.1161/01.cir.98.7.699
- Frangogiannis, Smith, & Entman. (2002). *The inflammatory response in myocardial infarction* (Vol. 53).

- Fuchs, Brill, & Wagner. (2012). Neutrophil Extracellular Trap (NET) Impact on Deep Vein Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(8), 1777-1783. doi: 10.1161/atvbaha.111.242859
- Fuson, Hubbard, Sugantharaj, Andrews, Beard, & Whittaker. (1983). Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Survey of Immunologic Research*, 2(4), 327-340. doi: 10.1007/BF02918449
- Garlisi, Kung, Wang, Minnicozzi, Umland, Chapman, *et al.* (1999). Effects of Chronic Anti-Interleukin-5 Monoclonal Antibody Treatment in a Murine Model of Pulmonary Inflammation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 20(2), 248-255. doi: 10.1165/ajrcmb.20.2.3327
- Goldenberg, & Moss. (2008). Long QT Syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*, 51(24), 2291-2300. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2008.02.068>
- Goldsby. (2006). *Immunology* (5th ed.).
- Grommes, & Soehnlein. (2011). Contribution of Neutrophils to Acute Lung Injury. *Molecular Medicine*, 17(3-4), 293-307. doi: 10.2119/molmed.2010.00138
- Gross, Gammon, Moss, Rauch, Harding, Heinecke, *et al.* (2009). Bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity in vivo. *Nat Med*, 15(4), 455-461. doi: 10.1038/nm.1886
- Gunzer. (2014). Traps and hyper inflammation – new ways that neutrophils promote or hinder survival. *British Journal of Haematology*, 164(2), 189-199. doi: 10.1111/bjh.12608
- Hadjantonakis, & Papaioannou. (2004). Dynamic in vivo imaging and cell tracking using a histone fluorescent protein fusion in mice. *BMC Biotechnology*, 4, 33-33. doi: 10.1186/1472-6750-4-33
- Hasegawa, Visovatti, Hyman, Hayasaki, & Pinsky. (2007). Heterotopic vascularized murine cardiac transplantation to study graft arteriopathy. *Nat. Protocols*, 2(3), 471-480.
- Hasenberg, Behnsen, Krappmann, Brakhage, & Gunzer. (2011). Phagocyte responses towards *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol*, 301(5), 436-444. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.04.012
- Hearn, & Mackenzie. (1980). Mycelial Antigens from Two Strains of *Aspergillus fumigatus*: An Analysis by Two-Dimensional Immunoelectrophoresis: Myzeliale Antigene aus zwei Stämmen von *Asperillus fumigatus*: Eke Analyse rnit der zweidimensionalen Immunelektrophorese. *Mycoses*, 23(10), 549-562. doi: 10.1111/j.1439-0507.1980.tb02557.x
- Hilton, McKinnon, Lord, Peron, & Forni. (2006). Unexplained acidosis of malnutrition: a study by ion-exchange chromatography/mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 20(12), 1386-1389. doi: 10.1002/bmc.712
- Hochweller, Striegler, Hammerling, & Garbi. (2008). A novel CD11c.DTR transgenic mouse for depletion of dendritic cells reveals their requirement for homeostatic proliferation of natural killer cells. *Eur J Immunol*, 38(10), 2776-2783. doi: 10.1002/eji.200838659
- Hohl, Van Epps, Rivera, Morgan, Chen, Feldmesser, *et al.* (2005). *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display. *PLoS Pathog*, 1(3), e30. doi: 10.1371/journal.ppat.0010030
- Howarth, Lee, & Uney. (2010). Using viral vectors as gene transfer tools (Cell Biology and Toxicology Special Issue: ETCS-UK 1 day meeting on genetic manipulation of cells). *Cell Biology and Toxicology*, 26(1), 1-20. doi: 10.1007/s10565-009-9139-5
- Huiskens, & Stainier. (2009). Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development*, 136(12), 1963-1975.
- Jackson, Higgins, & Lin. (2009). Conidiation Color Mutants of *Aspergillus fumigatus* Are Highly Pathogenic to the Heterologous Insect Host *Galleria mellonella*. *PLoS One*, 4(1), e4224. doi: 10.1371/journal.pone.0004224
- Jordan, Zhao, & Vinten-Johansen. (1999). *The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury* (Vol. 43).
- Jung, Aliberti, Graemmel, Sunshine, Kreutzberg, Sher, *et al.* (2000). Analysis of Fractalkine Receptor CX(3)CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *Molecular and Cellular Biology*, 20(11), 4106-4114.

- Jung, Unutmaz, Wong, Sano, De los Santos, Sparwasser, *et al.* (2002). In Vivo Depletion of CD11c(+) Dendritic Cells Abrogates Priming of CD8(+) T Cells by Exogenous Cell-Associated Antigens. *Immunity*, 17(2), 211-220.
- Kaese, & Verheule. (2012). Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size. *Front Physiol*, 3, 345. doi: 10.3389/fphys.2012.00345
- Kalantar-Zadeh, Mehrotra, Fouque, & Kopple. (2004). POOR NUTRITIONAL STATUS AND INFLAMMATION: Metabolic Acidosis and Malnutrition-Inflammation Complex Syndrome in Chronic Renal Failure. *Seminars in Dialysis*, 17(6), 455-465. doi: 10.1111/j.0894-0959.2004.17606.x
- Kami, Hori, Takaue, & Mutou. (2002). The Gastrointestinal Tract Is a Common Target of Invasive Aspergillosis in Patients Receiving Cytotoxic Chemotherapy for Hematological Malignancy. *Clinical Infectious Diseases*, 35(1), 105-106. doi: 10.1086/340717
- Kassim, Rajasagi, Zhao, Chervenak, & Jennings. (2006). In Vivo Ablation of CD11c-Positive Dendritic Cells Increases Susceptibility to Herpes Simplex Virus Type 1 Infection and Diminishes NK and T-Cell Responses. *Journal of Virology*, 80(8), 3985-3993. doi: 10.1128/jvi.80.8.3985-3993.2006
- Kochi, Johnson, & Dalmasso. (1991). Complement-mediated killing of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. Role of antibody in formation of an effective membrane attack complex. *The Journal of Immunology*, 146(11), 3964-3970.
- Kouro, & Takatsu. (2009). IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *International Immunology*, 21(12), 1303-1309. doi: 10.1093/intimm/dxp102
- Kruger, Saffarzadeh, Weber, Rieber, Radsak, von Bernuth, *et al.* (2015). Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog*, 11(3), e1004651. doi: 10.1371/journal.ppat.1004651
- Kwon-Chung, & Sugui. (2013). *Aspergillus fumigatus*—What Makes the Species a Ubiquitous Human Fungal Pathogen? *PLoS Pathog*, 9(12), e1003743. doi: 10.1371/journal.ppat.1003743
- Ladokhin. (2013). pH-triggered conformational switching along the membrane insertion pathway of the diphtheria toxin T-domain. *Toxins (Basel)*, 5(8), 1362-1380. doi: 10.3390/toxins5081362
- Lagrand, Visser, Hermens, Niessen, Verheugt, Wolbink, *et al.* (1999). C-Reactive Protein as a Cardiovascular Risk Factor: More Than an Epiphenomenon? *Circulation*, 100(1), 96-102. doi: 10.1161/01.cir.100.1.96
- Latge. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*, 12(2), 310-350.
- Latge. (2001). The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol*, 9(8), 382-389.
- Le Moine, Flamand, xE, ronique, Demoor, xE, *et al.* (1999). Critical roles for IL-4, IL-5, and eosinophils in chronic skin allograft rejection. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(12), 1659-1667. doi: 10.1172/JCI5504
- Leckie, Brinke, Khan, Diamant, O'Connor, Walls, *et al.* (2000). Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *The Lancet*, 356(9248), 2144-2148. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03496-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03496-6)
- Lehnert, Timme, Pollmächer, Hünninger, Kurzai, & Figge. (2015). Bottom-up modeling approach for the quantitative estimation of parameters in pathogen-host interactions. *Frontiers in Microbiology*, 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.00608
- Lemaitre, Nicolas, Michaut, Reichhart, & Hoffmann. (1996). The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell*, 86(6), 973-983. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80172-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80172-5)
- Lewis, Wiederhold, Chi, Han, Komanduri, Kontoyiannis, *et al.* (2005). Detection of Gliotoxin in Experimental and Human Aspergillosis. *Infection and Immunity*, 73(1), 635-637. doi: 10.1128/iai.73.1.635-637.2005
- Liesz, Zhou, Mracskó, Karcher, Bauer, Schwarting, *et al.* (2011). *Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke* (Vol. 134).

- Lilly, Gessner, Dunaway, Metz, Schwiebert, Weaver, *et al.* (2012). The β -Glucan Receptor Dectin-1 Promotes Lung Immunopathology during Fungal Allergy via IL-22. *The Journal of Immunology*, 189(7), 3653-3660. doi: 10.4049/jimmunol.1201797
- Lilly, Scopel, Nelson, Burg, Dunaway, & Steele. (2014). Eosinophil deficiency compromises lung defense against *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*, 82(3), 1315-1325. doi: 10.1128/IAI.01172-13
- Longo, Dietel, Harrison, & Charité. (2012). *Harrisons innere Medizin*. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag.
- Ludwig, Pereira, Zhu, Hicklin, & Bohlen. (2003). Monoclonal antibody therapeutics and apoptosis. *Oncogene*, 22(56), 9097-9106.
- Lupoglazoff, Cheav, Baroudi, Berthet, Denjoy, Cauchemez, *et al.* (2001). Homozygous SCN5A Mutation in Long-QT Syndrome With Functional Two-to-One Atrioventricular Block. *Circulation Research*, 89(2), e16-e21. doi: 10.1161/hh1401.095087
- MacDowell, Allen, & MacDowell. (1927). THE PRENATAL GROWTH OF THE MOUSE. *The Journal of General Physiology*, 11(1), 57-70. doi: 10.1085/jgp.11.1.57
- Madias. (2008). Low QRS voltage and its causes. *J Electrocardiol*, 41(6), 498-500. doi: 10.1016/j.jelectrocard.2008.06.021
- Maekawa, Wada, Kanda, Niwa, Yamada, Saito, *et al.* (2002). Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor- α . *Journal of the American College of Cardiology*, 39(7), 1229-1235. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097\(02\)01738-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(02)01738-2)
- Maloney. (2012). Anti-CD20 Antibody Therapy for B-Cell Lymphomas. *New England Journal of Medicine*, 366(21), 2008-2016. doi: doi:10.1056/NEJMct1114348
- Martin, & Resch. (2009). *Immunologie*: UTB GmbH.
- Martinod, & Wagner. (2014). *Thrombosis: tangled up in NETs* (Vol. 123).
- Masterson, McNamee, Fillon, Hosford, Harris, Fernando, *et al.* (2014). Eosinophil-mediated signalling attenuates inflammatory responses in experimental colitis. *Gut*. doi: 10.1136/gutjnl-2014-306998
- Mayadas, Cullere, & Lowell. (2014). The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol*, 9, 181-218. doi: 10.1146/annurev-pathol-020712-164023
- McDonald, Pittman, Menezes, Hirota, Slaba, Waterhouse, *et al.* (2010). Intravascular Danger Signals Guide Neutrophils to Sites of Sterile Inflammation. *Science*, 330(6002), 362-366. doi: 10.1126/science.1195491
- Medzhitov, Preston-Hurlburt, & Janeway. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640), 394-397.
- Mehrad, Strieter, Moore, Tsai, Lira, & Standiford. (1999). CXC Chemokine Receptor-2 Ligands Are Necessary Components of Neutrophil-Mediated Host Defense in Invasive Pulmonary Aspergillosis. *The Journal of Immunology*, 163(11), 6086-6094.
- Merza, Hartman, Rahman, Hwaiz, Zhang, Renstrom, *et al.* (2015). Neutrophil Extracellular Traps Induce Trypsin Activation, Inflammation, and Tissue Damage in Mice with Severe Acute Pancreatitis. *Gastroenterology*. doi: 10.1053/j.gastro.2015.08.026
- Milam, Erb-Downward, Chen, Osuchowski, McDonald, Chensue, *et al.* (2010). CD11c(+) Cells Are Required to Prevent Progression from Local Acute Lung Injury to Multiple Organ Failure and Death. *The American Journal of Pathology*, 176(1), 218-226. doi: 10.2353/ajpath.2010.081027
- Mircescu, Lipuma, van Rooijen, Pamer, & Hohl. (2009). Essential role for neutrophils but not alveolar macrophages at early time points following *Aspergillus fumigatus* infection. *J Infect Dis*, 200(4), 647-656. doi: 10.1086/600380
- Molawi, Wolf, Kandalla, Favret, Hagemeyer, Frenzel, *et al.* (2014). Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. *The Journal of Experimental Medicine*, 211(11), 2151-2158. doi: 10.1084/jem.20140639

- Munshi. (2012). Gene regulatory networks in cardiac conduction system development. *Circ Res*, 110(11), 1525-1537. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.260026
- Murphy. (2011). *Janeway's Immunobiology* (7th ed.).
- Murphy. (2012). *Janeway's immunobiology*. New York: Garland Science.
- Murray, & Little. (1967). Genetic Studies of Carcinogenesis in Mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 38(5), 639-656. doi: 10.1093/jnci/38.5.639
- Nauta, Daha, Tijsma, van de Water, Tedesco, & Roos. (2002). The membrane attack complex of complement induces caspase activation and apoptosis. *European Journal of Immunology*, 32(3), 783-792. doi: 10.1002/1521-4141(200203)32:3<783::AID-IMMU783>3.0.CO;2-Q
- Neofytos, Horn, Anaissie, Steinbach, Olyaei, Fishman, *et al.* (2009). Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clin Infect Dis*, 48(3), 265-273. doi: 10.1086/595846
- Neu, Eiselt, Paul, Sauter, Stallmeyer, Isbrandt, *et al.* (2010). A homozygous SCN5A mutation in a severe, recessive type of cardiac conduction disease. *Human Mutation*, 31(8), E1609-E1621. doi: 10.1002/humu.21302
- Neumann, Riek-Burchardt, Herz, Doeppner, Konig, Hutten, *et al.* (2015). Very-late-antigen-4 (VLA-4)-mediated brain invasion by neutrophils leads to interactions with microglia, increased ischemic injury and impaired behavior in experimental stroke. *Acta Neuropathol*, 129(2), 259-277. doi: 10.1007/s00401-014-1355-2
- Nierman, Pain, Anderson, Wortman, Kim, Arroyo, *et al.* (2005). Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 438(7071), 1151-1156. doi: 10.1038/nature04332
- O'Byrne, Inman, & Parameswaran. (2001). The trials and tribulations of IL-5, eosinophils, and allergic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108(4), 503-508. doi: <http://dx.doi.org/10.1067/mai.2001.119149>
- O'Gorman, Fuller, & Dyer. (2009). Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 457(7228), 471-474. doi: 10.1038/nature07528
- Ochkur, Jacobsen, Protheroe, Biechele, Pero, McGarry, *et al.* (2007). Coexpression of IL-5 and Eotaxin-2 in Mice Creates an Eosinophil-Dependent Model of Respiratory Inflammation with Characteristics of Severe Asthma. *The Journal of Immunology*, 178(12), 7879-7889. doi: 10.4049/jimmunol.178.12.7879
- Oka, Hikoso, Yamaguchi, Taneike, Takeda, Tamai, *et al.* (2012). Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature*, 485(7397), 251-255. doi: <http://www.nature.com/nature/journal/v485/n7397/abs/nature10992.html#supplementary-information>
- Papadatos, Wallerstein, Head, Ratcliff, Brady, Benndorf, *et al.* (2002). Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(9), 6210-6215. doi: 10.1073/pnas.082121299
- Pappenheimer, & Randall. (1975). On the alleged high sensitivity of mouse Ehrlich-Lettre ascites tumor cells to diphtheria toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(8), 3149-3152.
- Pfahnl, Viswanathan, Weiss, Shang, Sanyal, Shusterman, *et al.* (2007). A Sodium Channel Pore Mutation Causing Brugada Syndrome. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*, 4(1), 46-53. doi: 10.1016/j.hrthm.2006.09.031
- Philippe, Ibrahim-Granet, Prevost, Gougerot-Pocidalo, Sanchez Perez, Van der Meeren, *et al.* (2003). Killing of *Aspergillus fumigatus* by Alveolar Macrophages Is Mediated by Reactive Oxidant Intermediates. *Infection and Immunity*, 71(6), 3034-3042. doi: 10.1128/iai.71.6.3034-3042.2003
- Pinto, Godwin, & Rosenthal. (2014). Macrophages in cardiac homeostasis, injury responses and progenitor cell mobilisation. *Stem Cell Research*, 13(3, Part B), 705-714. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2014.06.004>

- Pinto, Paolicelli, Salimova, Gospocic, Slonimsky, Bilbao-Cortes, *et al.* (2012). An Abundant Tissue Macrophage Population in the Adult Murine Heart with a Distinct Alternatively-Activated Macrophage Profile. *PLoS One*, 7(5), e36814. doi: 10.1371/journal.pone.0036814
- Pollmacher, & Figge. (2015). Deciphering chemokine properties by a hybrid agent-based model of *Aspergillus fumigatus* infection in human alveoli. *Front Microbiol*, 6, 503. doi: 10.3389/fmicb.2015.00503
- Poltorak, He, Smirnova, Liu, Huffel, Du, *et al.* (1998). Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science*, 282(5396), 2085-2088. doi: 10.1126/science.282.5396.2085
- Probst, Tschannen, Odermatt, Schwendener, Zinkernagel, & Van Den Broek. (2005). Histological analysis of CD11c-DTR/GFP mice after in vivo depletion of dendritic cells. *Clin Exp Immunol*, 141(3), 398-404. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02868.x
- Quinn. (2014). *Neutrophil Methods and Protocols* (2nd ed.): Humana Press.
- Raev. (1996). A case of spontaneous left-sided pneumothorax with ECG changes resembling acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*, 56(2), 197-199. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0167-5273\(96\)02739-8](http://dx.doi.org/10.1016/0167-5273(96)02739-8)
- Rahman, Manuel, Khan, Wigdahl, Acheampong, Tangy, *et al.* (2010). Depletion of Dendritic Cells Enhances Susceptibility to Cell-Free Infection of Human T Cell Leukemia Virus Type 1 in CD11c-Diphtheria Toxin Receptor Transgenic Mice. *The Journal of Immunology*, 184(10), 5553-5561. doi: 10.4049/jimmunol.0903226
- Rhodes. (2006). *Aspergillus fumigatus*: Growth and virulence. *Medical Mycology*, 44(Supplement 1), S77-S81. doi: 10.1080/13693780600779419
- Riccardi, & Nicoletti. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat. Protocols*, 1(3), 1458-1461. doi: 10.1038/nprot.2006.238
- Ridker. (2001). High-Sensitivity C-Reactive Protein: Potential Adjunct for Global Risk Assessment in the Primary Prevention of Cardiovascular Disease. *Circulation*, 103(13), 1813-1818. doi: 10.1161/01.cir.103.13.1813
- Rink. (2012). *Immunologie für Einsteiger*.
- Ruan, Liu, & Priori. (2009). Sodium channel mutations and arrhythmias. *Nat Rev Cardiol*, 6(5), 337-348.
- Sadhu, Ting, Lipsky, Hensley, Garcia-Martinez, Simon, *et al.* (2007). CD11c/CD18: novel ligands and a role in delayed-type hypersensitivity. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(6), 1395-1403. doi: 10.1189/jlb.1106680
- Sahoo, Del Barrio, Miller, & Re. (2014). Neutrophil elastase causes tissue damage that decreases host tolerance to lung infection with burkholderia species. *PLoS Pathog*, 10(8), e1004327. doi: 10.1371/journal.ppat.1004327
- Saito, Iwawaki, Taya, Yonekawa, Noda, Inui, *et al.* (2001). Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nat Biotech*, 19(8), 746-750.
- Schaffner, Douglas, Braude, & Davis. (1983). Killing of *Aspergillus* spores depends on the anatomical source of the macrophage. *Infection and Immunity*, 42(3), 1109-1115.
- Schindler, Gutierrez, Beineke, Rauter, Rohde, Foster, *et al.* (2012). Dendritic Cells Are Central Coordinators of the Host Immune Response to *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection. *The American Journal of Pathology*, 181(4), 1327-1337. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.039>
- Schott, Alshinawi, Kyndt, Probst, Hoorntje, Hulsbeek, *et al.* (1999). Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet*, 23(1), 20-21.
- Seidel, Schlegel, & Lang. (2013). Natural Killer Cell Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Tumor Immunotherapy with Therapeutic Antibodies. *Frontiers in Immunology*, 4, 76. doi: 10.3389/fimmu.2013.00076
- Shapiro, Robbins, & Cowen. (2011). Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(2), 213-267. doi: 10.1128/mmbr.00045-10

- Silverthorn, & Weber. (2009). *Physiologie*: Pearson Deutschland.
- Smeeth, Thomas, Hall, Hubbard, Farrington, & Vallance. (2004). Risk of Myocardial Infarction and Stroke after Acute Infection or Vaccination. *New England Journal of Medicine*, 351(25), 2611-2618. doi: doi:10.1056/NEJMoa041747
- Smith, Zarbock, Stark, Burcin, Bruce, Foley, *et al.* (2007). IL-23 Is Required for Neutrophil Homeostasis in Normal and Neutrophilic Mice. *The Journal of Immunology*, 179(12), 8274-8279. doi: 10.4049/jimmunol.179.12.8274
- Smits, Koopmann, Wilders, Veldkamp, Opthof, Bhuiyan, *et al.* (2005). A mutation in the human cardiac sodium channel (E161K) contributes to sick sinus syndrome, conduction disease and Brugada syndrome in two families. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 38(6), 969-981. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2005.02.024>
- Soehnlein, Oehmcke, X, Rothfuchs, Frithiof, van Rooijen, *et al.* (2008). Neutrophil degranulation mediates severe lung damage triggered by streptococcal M1 protein. *European Respiratory Journal*, 32(2), 405-412.
- Staib, Mishra, Rajendran, Voigt, Steffen, Neumann, *et al.* (1980). A Notable Aspergillus from a Mortal Aspergilloma of the Lung New Aspects of the Epidemiology, Serodiagnosis and Taxonomy of Aspergillus fumigatus. *Zentralblatt für Bakteriologie. 1. Abt. Originale A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie*, 247(4), 530-536. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0172-5599\(80\)80059-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0172-5599(80)80059-9)
- Stark, Huo, Burcin, Morris, Olson, & Ley. (2005). Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*, 22(3), 285-294. doi: 10.1016/j.immuni.2005.01.011
- Stephens-Romero, Mednick, & Feldmesser. (2005). The Pathogenesis of Fatal Outcome in Murine Pulmonary Aspergillosis Depends on the Neutrophil Depletion Strategy. *Infection and Immunity*, 73(1), 114-125. doi: 10.1128/IAI.73.1.114-125.2005
- Stewart, Thiel, & Hogg. (1995). Leukocyte integrins. *Current Opinion in Cell Biology*, 7(5), 690-696. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80111-1](http://dx.doi.org/10.1016/0955-0674(95)80111-1)
- Sturm, Dyer, Percopo, Heinemann, & Rosenberg. (2013). Chemotaxis of bone marrow derived eosinophils in vivo: a novel method to explore receptor-dependent trafficking in the mouse. *Eur J Immunol*, 43(8), 2217-2228. doi: 10.1002/eji.201343371
- Takatsu, & Nakajima. (2008). IL-5 and eosinophilia. *Current Opinion in Immunology*, 20(3), 288-294. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2008.04.001>
- Taketo, Schroeder, Mobraaten, Gunning, Hanten, Fox, *et al.* (1991). FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(6), 2065-2069.
- Tamoutounour, Williams, Montanana Sanchis, Liu, Terhorst, Malosse, *et al.* Origins and Functional Specialization of Macrophages and of Conventional and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Mouse Skin. *Immunity*, 39(5), 925-938. doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.004
- Tan, Bink-Boelkens, Bezzina, Viswanathan, Beaufort-Krol, van Tintelen, *et al.* (2001). A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature*, 409(6823), 1043-1047.
- Thakur, Li, Chandy, John, & Gibbons. (1996). Transient Neutropenia: Neutrophil Distribution and Replacement. *Journal of Nuclear Medicine*, 37(3), 489-494.
- Thiesse, Namati, Sieren, Smith, Reinhardt, Hoffman, *et al.* (2010). Lung structure phenotype variation in inbred mouse strains revealed through in vivo micro-CT imaging. *J Appl Physiol* (1985), 109(6), 1960-1968. doi: 10.1152/japplphysiol.01322.2009
- Thomas, & Schroder. (2013). Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends Immunol*, 34(7), 317-328. doi: 10.1016/j.it.2013.02.008
- Tian, Woodworth, Sköld, & Behar. (2005). In Vivo Depletion of CD11c+ Cells Delays the CD4+ T Cell Response to Mycobacterium tuberculosis and Exacerbates the Outcome of Infection. *The Journal of Immunology*, 175(5), 3268-3272. doi: 10.4049/jimmunol.175.5.3268

- Tittel, Heuser, Ohliger, Llanto, Yona, Hammerling, *et al.* (2012). Functionally relevant neutrophilia in CD11c diphtheria toxin receptor transgenic mice. *Nat Methods*, 9(4), 385-390. doi: 10.1038/nmeth.1905
- van Rijt, Jung, Kleinjan, Vos, Willart, Duez, *et al.* (2005). In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med*, 201(6), 981-991. doi: 10.1084/jem.20042311
- Van Rooijen. (1989). The liposome-mediated macrophage 'suicide' technique. *Journal of Immunological Methods*, 124(1), 1-6. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90178-6](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(89)90178-6)
- van Rooijen, Sanders, & van den Berg. (1996). Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine. *Journal of Immunological Methods*, 193(1), 93-99. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00056-7](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(96)00056-7)
- van Rooijen, & van Nieuwmegen. (1984). Elimination of phagocytic cells in the spleen after intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. An enzyme-histochemical study. *Cell Tissue Res*, 238(2), 355-358.
- Waldorf, Levitz, & Diamond. (1984). In Vivo Bronchoalveolar Macrophage Defense Against *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Infectious Diseases*, 150(5), 752-760. doi: 10.1093/infdis/150.5.752
- Wang, Tang, & Yenari. (2007). THE INFLAMMATORY RESPONSE IN STROKE. *Journal of Neuroimmunology*, 184(1-2), 53-68. doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.11.014
- Warren-Gash, Hayward, Hemingway, Denaxas, Thomas, Timmis, *et al.* (2012). Influenza Infection and Risk of Acute Myocardial Infarction in England and Wales: A CALIBER Self-Controlled Case Series Study. *Journal of Infectious Diseases*. doi: 10.1093/infdis/jis597
- Wu, Kuzmenko, Wan, Schaffer, Weiss, Fisher, *et al.* (2003). Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. *Journal of Clinical Investigation*, 111(10), 1589-1602. doi: 10.1172/JCI200316889
- Yamada, Tani, Nakanishi, Taguchi, Arita, & Arai. (2011). Eosinophils promote resolution of acute peritonitis by producing proresolving mediators in mice. *FASEB J*, 25(2), 561-568. doi: 10.1096/fj.10-170027
- Youngchim. (2004). Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical Microbiology*, 53(3), 175-181. doi: 10.1099/jmm.0.05421-0
- Zaft, Sapoznikov, Krauthgamer, Littman, & Jung. (2005). CD11c^{high} Dendritic Cell Ablation Impairs Lymphopenia-Driven Proliferation of Naive and Memory CD8⁺ T Cells. *The Journal of Immunology*, 175(10), 6428-6435. doi: 10.4049/jimmunol.175.10.6428
- Zhang, Raoof, Chen, Sumi, Sursal, Junger, *et al.* (2010). Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*, 464(7285), 104-107. doi: http://www.nature.com/nature/journal/v464/n7285/supinfo/nature08780_S1.html

8. Anlagen

8.1 Danksagung

Die Danksagung ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

8.2 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

8.3 Erklärungen

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Charakterisierung der Diphtherietoxin-vermittelten Mortalität im transgenen CD11cDTR Mausmodell“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Linda Männ befürworte.

Essen, den _____

Prof. Dr. Matthias Gunzer _____

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Linda Männ _____

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Linda Männ _____